



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 35 115 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 P 1/00
C 12 P 7/64
C 12 M 1/40
C 12 Q 1/26

②① Aktenzeichen: 199 35 115.5
②② Anmeldetag: 27. 7. 1999
④③ Offenlegungstag: 1. 2. 2001

DE 199 35 115 A 1

⑦① Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

⑦④ Vertreter:
Kinzebach, W., Dipl.-Chem. Dr.phil., Pat.-Anw.,
67059 Ludwigshafen

⑦② Erfinder:
Hauer, Bernhard, Dr., 67136 Fußgönheim, DE;
Schmid, Rolf D., Prof Dr., 70569 Stuttgart, DE;
Schwanenberg, Ulrich, 70199 Stuttgart, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Elektronendonorsystem für Enzyme
⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein neuartiges Elektronendonorsystem für Enzyme mit Redoxeigenschaften und dessen Verwendung in enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen, wie insbesondere der Herstellung

DE 199 35 115 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein neuartiges Elektronendonorsystem für Enzyme mit Redoxeigenschaften, und dessen Verwendung in enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen, wie insbesondere der Herstellung ω -hydroxylierter Fettsäuren. Die Erfindung betrifft außerdem ein verbessertes Nachweisverfahren für Fettsäuremonooxygenasen, Bioreaktoren sowie Testkits, worin das Elektronendonorsystem vorteilhaft einsetzbar ist.

Die biotechnologische Nutzung von Enzymen mit Redoxeigenschaften, wie z. B. von Monooxygenasen, in zellfreien Reaktionssystemen ist grundsätzlich mit dem Problem behaftet, daß die Verwendung natürlicher Cofaktoren zur Bereitstellung der erforderlichen Redox-Äquivalente (wie z. B. von NADH oder NADPH) mit unverhältnismäßig hohen Kosten verbunden ist.

Dies gilt auch für die biotechnologische Nutzung von Cytochrom P450 haltige Monooxygenasen. Funktionell ist allen P450-Enzymen gemeinsam, Sauerstoff-Atome auf nicht aktivierte aliphatische oder aromatische X-H ($x = -C, -N, -S$) Bindungen zu übertragen. Darüber hinaus vermögen P450-Enzyme $-C=C-$ Doppelbindung zu epoxidieren. Für diese Oxygenierungsreaktionen benötigen die meisten P450-Systeme Cofaktoren, wie NADPH oder NADH, als Elektronenquelle. Entsprechend der Realisierung dieses e-Transfersystems (Reduktasesystems) unterteilt man P450-Systeme in vier Klassen. Klasse I P450-Enzyme enthalten als Reduktase eine FAD-Domäne und ein weiteres Fe-S-Protein (zumeist mitochondriale und bakterielle P450-Enzyme), Klasse II P450-Enzyme besitzen eine FAD/FMN-Reduktase (meist ER-P450-Enzyme) und Klasse III P450-Enzyme benötigen keine weiteren Reduktionsäquivalente, sie setzen peroxygenierte Substrate um, die den Sauerstoff bereits enthalten. Das einzige P450-Enzym der Klasse IV erhält seine Elektronen direkt ohne Transfersystem von NADH.

Die funktionelle Vielfalt der durch P450-Systeme katalysierten Monooxygenierungen auf chemischem Wege häufig nur schwer zugänglicher Verbindungen bieten ein enormes biotechnologisches, pharmakologisches und toxikologisches Potential. Eine wichtige Voraussetzung zur in vitro Nutzung dieser Potentiale ist die Entwicklung geeigneter Expressions-, Reinigungs- und vor allem Aktivitätsnachweissysteme, die erlauben, P450-Systeme zu charakterisieren und Enzymvarianten mit "verbesserten" Eigenschaften aufzufinden.

Weitere wichtige Voraussetzung für die Nutzung dieser p450 Monooxygenasen, insbesondere der Klassen I und II, wäre die Verfügbarkeit eines kostengünstigen Elektronendonorsystems.

Ein NADPH-Cofaktor-Recycling-System wurde von Deffner et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. (1987) 501, 171 vorgestellt. Dieses stellt aber bei Anwendung im präparativen Maßstab ein Kostenproblem dar und gestaltet Reaktionsführungen in Enzym-Membran-Reaktoren komplizierter. Deshalb wurde nach alternativen Elektronendonoren gesucht. Ein vielversprechenden Weg stellt die elektrochemische Reduktion von P450-Enzymen dar. Estabrook et al. (Methods Enzymol. (1996) 272, 44) konnten mittels eines Co(III)sepulchrat-Mediatorsystems und Pt-Elektroden für sechs verschiedene P450-Enzyme Umsätze bestimmen. Die Aktivitäten waren jedoch etwa 8-fach geringer als beim Reduktionsäquivalent NADPH. Statt des Mediators wurde in Natriumdithionit (Fang et al., Drug. Metab. Dispos. (1996) 24 (11): 1282) eine Verbindung gefunden, die P450-Enzyme direkt reduziert. Im Falle von P450 BM-3 war die Aktivität mit Natriumdithionit gegenüber NADPH um Faktor 8150 reduziert; vermutlich wird P450 BM-3 durch Natriumdithionit dreifach reduziert und damit größtenteils inaktiviert.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein kostengünstiges, effizientes, alternatives Elektronendonorsystem für Enzyme mit Redoxeigenschaften bereitzustellen. Insbesondere sollte dieses System in biochemischen Umsetzungen verwendbar sein, an welchen Cytochrom P450-haltige Enzyme beteiligt sind. Außerdem sollte ein verbessertes Nachweisverfahren für p450-Enzyme bereitgestellt werden. Eine weitere Aufgabe der Erfindung bestand in der Bereitstellung eines verbesserten biotechnologischen Verfahrens zur enzymatischen Übertragung von Sauerstoff auf organische Moleküle und insbesondere zur terminalen oder subterminalen Hydroxylierung von Fettsäuren.

Diese Aufgaben wurde überraschenderweise gelöst durch Bereitstellung eines Elektronendonorsystems für die Übertragung von Elektronen auf Enzyme mit Redox-Eigenschaften, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das System eine anorganische, nicht elektrodengebundene Elektronenquelle und einen Mediator umfaßt, der zur Übertragung von Elektronen von der Elektronenquelle auf das Enzym befähigt ist. Dabei können die Komponenten des Systems einzeln oder im Gemisch, in geträgerter oder vorzugsweise ungeträgerter Form vorliegen.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Elektronendonorsystem ist insbesondere für Cytochrom P450-haltige Enzyme, wie z. B. die in der großen Familie der Monooxygenasen (E. C. 1.14.-.-) zusammengefassten Enzyme, anwendbar.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Elektronendonorsystems umfaßt dieses einen Mediator mit einem Standard-Normalpotential im Bereich von weniger als etwa $-0,4$ V. Nichtlimitierende Beispiele für Mediatoren sind Kobalt(III)sepulchrat, Methylviologen, Neutralrot, Riboflavin, Rutheniumtriacetat, FMN und FAD, wobei Kobalt(III)sepulchrat bevorzugt ist.

Das erfindungsgemäße Elektronendonorsystem umfaßt vorzugsweise als Elektronenquelle ein Metall mit einem niedrigeren Standard-Normalpotential als der Mediator. Als nichtlimitierendes Beispiel für die Elektronenquelle ist metallisches Zink zu nennen. Das Metall liegt dabei vorzugsweise in einer reaktiven Form, d. h. mit großer Oberfläche, wie z. B. pulverförmig, vor.

Bevorzugte erfindungsgemäße Elektronendonorsysteme umfassen, folgende Kombinationen von Elektronenquelle und Mediator:

- Zn/Kobalt(III)sepulchrat oder
- Zn/Neutralrot.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Oxidation von, d. h. Übertragung von

Sauerstoff auf, ein Kohlenwasserstoff-haltiges Wasserstoffdonor-Molekül, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man das Wasserstoff-Donormolekül in einem Reaktionsmedium, umfassend das Sauerstoff-übertragenden Enzym und ein Elektronendonorsystem gemäß obiger Definition, in Gegenwart von Sauerstoff unter Reaktionsbedingungen inkubiert.

Eine "Oxidation" im Sinne der vorliegenden Erfindung betrifft enzymkatalysierte Oxidationsreaktionen im weitesten Sinne. Insbesondere umfaßt der Begriff Oxidationsreaktionen welche Enzymen aus der Klasse der von Monooxygenasen (E. C.1.14.-) und vor allem von Cytochrom P450-Enzymen katalysiert werden. Diese Oxidationsreaktionen umfassen:

- a) Kohlenstoff-Oxidationen an gesättigten oder ungesättigten, aliphatischen oder aromatischen Kohlenstoffatomen
- b) Schwefel-Oxidationen;
- c) Stickstoff-Oxidationen;
- d) oxidative Dealkylierungen; und
- e) oxidative Dehalogenierungen.

Dabei ist das Wasserstoff-Donormolekül vorzugsweise ausgewählt unter Verbindungen der Formel

R-X

worin

R für einen geradkettigen oder verzweigten, vorzugsweise geradkettigen, Alkylrest mit 10 oder mehr Kohlenstoffatomen, wie z. B. 10 bis 30 Kohlenstoffatomen, steht, und

X für eine polare, zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigte Gruppe, vorzugsweise eine Carboxy-, Amid-, Nitril-, Sulfat-, Sulfon-, Amin- oder Hydroxygruppe, steht.

Eine bevorzugte Variante obigen Verfahrens betrifft die enzymatische Herstellung terminal oder subterminal (d. h. in Position ω -1 bis ω -4) hydroxylierter Fettsäuren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) eine hydroxylierbare Fettsäure oder Fettsäurederivat in Gegenwart eines Elektronendonorsystems gemäß obiger Definition mit einer Cytochrom P-450 Monooxygenase und Sauerstoff umsetzt; und
- b) das (die) hydroxylierte(n) Produkte) isoliert.

Das ω -hydroxylierbare Fettsäurederivat ist erfindungsgemäß bevorzugt ausgewählt unter terminal gesättigten, verzweigten oder unverzweigten Fettsäuren mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen, insbesondere C_{12} - C_{30} -Fettsäuren.

In den oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren verwendet man bevorzugte als Enzym eine Cytochrom P-450 Monooxygenase, die ausgewählt ist unter:

- dem aus *Bacillus megaterium* (DSM 32T) isolierbaren Wildtypenzym; oder
- einer durch Aminosäuresubstitution in wenigstens einer der Position 26, 47, 72, 74, 87, 188 und 354 erhältlichen Mutanten des Wildtypenzym.

Bevorzugt eingesetzte Mutanten umfassen eine Mutation in Position 87 und sind ausgewählt unter den Mutation F87A oder F87V die gegebenenfalls wenigstens eine weitere der folgenden Mutationen aufweist: L188K, A74G, R47F und V26T. Besonders bevorzugt ist die Einfachmutante F87A und die Fünffachmutante F87A, L188K, A74G, R47F, V26T (Angabe der Aminosäuren im Einbuchstaben-Code; ursprüngliche Aminosäure links von der Positionsangabe; neue Aminosäure rechts von der Positionsangabe).

Vorzugsweise werden obige Verfahren unter Verwendung des Elektronendonorsystem Zink/Co(III)sepulchrat durchgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens führte man die Umsetzung in Gegenwart von Chloridionen durch.

Außerdem kann die Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms vorteilhaft sein.

Eine weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft einen Bioreaktor zur Verwendung bei der enzymatischen Übertragung von Sauerstoff auf ein Kohlenwasserstoff-haltiges Wasserstoffdonor-Molekül, und insbesondere zur Verwendung bei der Herstellung ω -hydroxylierter Fettsäuren, der gekennzeichnet ist durch eine immobilisierte Monooxygenase und ein Elektronendonorsystem gemäß obiger Definition im flüssigen Reaktionsmedium.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Nachweisverfahren für Fettsäure-Monooxygenasen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) einen Analyten, in dem man Enzymaktivität vermutet, mit einer ω -hydroxylierbaren Fettsäure oder Fettsäurederivat, welche(s) einen terminalen, abspaltbaren Fluorophors oder Chromophor trägt, in Gegenwart eines Elektronendonorsystems gemäß obiger Definition inkubiert; und
- b) die Abspaltung des Fluorophors oder Chromophors qualitativ oder quantitativ bestimmt.

Die Umsetzung führt man dabei bevorzugt in Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms und gegebenenfalls in Gegenwart von Chloridionen durch.

Beispiele für geeignete Fluorophore und Chromophore sind Phenole, Catechole, Hydroxycoumarine, wie Umbelliferon, Phenoxazine und insbesondere Resofurin.

Die Einstellung der optimalen Verfahrensparameter ist unter Berücksichtigung der Anweisungen im folgenden experimentellen Teil ohne weiteres möglich. So erzielt man z. B., ohne darauf beschränkt zu sein, eine Cobalt(III)sepulchrat-Konzentration von mehr als 0,1 mM, wie z. B. 0,5 bis 1,0 mM besonders vorteilhaft; ebenso wie ein pH-Wert etwa 8 bis 8,5; eine Zink-Konzentration von mehr als etwa 2 mg/ml wie z. B. etwa 5 bis 50 mg/ml.

Schließlich betrifft die Erfindung als weiteren Gegenstand einen Testkit, umfassend ein Elektronendonorsystem nach obiger Definition.

Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung wird in den folgenden Anschnitten weiter erläutert.

Katalysierte Reaktionen von P450-Systemen und Beispiele industrieller Anwendungen in der Feinchemikaliensynthese

In Organismen dienen Cytochrom P450-Enzyme unter anderem der Ergosterol-Synthese, der Biosynthese von Insekten- und Phytohormonen, der Ausbildung von Fruchtreife, Geruch und Farbe bei Pflanzen, der Biosynthese von Glukon- und Mineralcorticoiden, der Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen, dem Metabolismus von Retinoiden zur Regulation von normalem und epithelialem Wachstum/Differenzierung, Arachidonsäurestoffwechsel zur Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen und der Bildung vasoaktiver Produkte. Darüber hinaus dienen sie zur Aktivierung und Detoxifizierung xenobiotischer Stoffe.

P450-Enzyme gehören zu den sogenannten Phase I Enzymen, die mittels Oxygenierungen wasserunlösliche oder schwer lösliche Verbindungen zur weiteren Metabolisierung vorbereiten. Dazu dienen Phase II Enzyme wie Glutathion-Transferasen, N-Acetyltransferase oder Sulfotransferase, die eine polare Gruppe an jene hydroxylierten oder epoxidierten Verbindungen addieren. Dadurch werden diese Metabolite wasserlöslich und somit bioverfügbar. Die Vielfalt von Reaktionen, die durch Cytochrom P450-Enzyme katalysiert werden, sind im folgenden zusammengefaßt und hinsichtlich ihrer wirtschaftlichen und funktionellen Bedeutung diskutiert. Eine Übersicht, aufgeschlüsselt anhand ausgewählter Familien findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1

P450-Familie	Reaktionen von P450 Enzymen
CYP1-3	Metabolisierung xenobiotischer Stoffe; CYP1: PCB, PAH, Dioxine, Aflatoxine; CYP2: Pflanzentoxine, Pestizide; CYP3: Cyclosporine, Erythromycin, ferner beteiligt am Steroidmetabolismus
CYP4, CYP52, CYP102	CYP4, CYP52, CYP102: terminale und/oder subterminale Oxidation von Fettsäuren CYP4: Oxidation von Eicosanoiden (Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen)
CYP11, CYP17, CYP21	Biosynthese von Gluko- und Mineralcorticoiden; CYP11: 11- β -Hydroxylasen, Hydroxylierung von Deoxycorticosteron oder Deoxycortisol; CYP17: Steroid-17 α -hydroxylase; CYP21: Steroid-21-hydroxylase
CYP19	Umsetzung von Steroiden zu Östrogenen; Aromatase
CYP27	Cholesterol-27-hydroxylase

Die P450-Enzyme der Enzymfamilien CYP1-3 sind hauptverantwortlich für die Metabolisierung xenobiotischer Stoffe; die dabei auftretenden oxidativen Reaktionen sind im folgenden unterteilt in C-, S-, N-Oxidation, Dealkylierung und Dehalogenierung.

a) C-Oxidationen

P450-Enzyme hydroxylieren oder epoxidieren nichtaktivierte C-H-Bindungen und/oder C=C-Doppelbindungen in aliphatischen und aromatischen Systemen. Die gebildeten Metabolite sind häufig toxisch, wie das Nervengift 2,5-Hexandion oder karzinogen wie DNA-alkylierende Epoxide (z. B. Styroloxid). Ferner wirken durch P450-Enzyme C-oxidierte Nitrosamine und Benzpyrene karzinogen.

Arzneimittel, wie Barbiturate und Phenobarbitale, werden ebenfalls durch P450-Enzyme in ihre Wirkform überführt. Die Hydroxylierung nicht aktivierter -C-H Bindungen ist wegen der seltenen Konkurrenz durch chemische Verfahren eine der nützlichsten Biotransformationsreaktionen. Im Gegensatz zu Radikalreaktionen zeigen Bio-Hydroxylierungsre-

aktionen an C-Atomen folgende Aktivitätsreihe: sekundär > tertiär > primär. Bekannte industriell durchgeführte Verfahren sind die Progesteron-Hydroxylierung an 11 α -Position mittels *Aspergillus niger*, die etwa die Hälfte der 37 konventionellen Schritte erübrigte, und die 7 β -Hydroxylierung von 3 α -Hydroxy-5 β -cholsäure durch *Fusarium equiseti*. Das Produkt Ursodesoxycholsäure vermag Cholesterin aufzulösen und wird in der Behandlung von Gallensteinen eingesetzt. In der asymmetrischen Synthese werden Biotransformationen unter anderem zur Synthese von β -Hydroxybuttersäure, einem Ausgangsmaterial für Vitaminsynthesen (α -Tocopherol), von Geschmacksstoffen, von Antibiotika (Calcimycin) und von chiralen verzweigten epoxidierten Alkenen verwendet.

b) N-Oxidation/S-Oxidation

P450-Enzyme hydroxylieren Aryl- und Acetylamine wie Benzidin, 4-Biphenylamin und 2-Acetaminofluoren und vergleichbare Heterozyklen, die beim Anbrennen von Nahrungsmitteln entstehen, am N-Atom. Nach weiterer Acetylierung oder Sulfonierung der Hydroxygruppen entstehen elektrophile, stark karzinogen wirkende Substanzen.

Aryl- und Alkylthioether werden durch P450-Monooxygenasen direkt am S-Atom zu Sulfoxiden oxidiert. Die Oxidation bleibt jedoch häufig nicht auf der Stufe des Sulfoxids stehen; viele Sulfoxide werden zu den entsprechenden Sulfonverbindungen weiteroxidiert, die häufig zelltoxisch wirken. Mikrobielle Oxidationen von chiralen Dithioacetalen gelingen mit hohem Enantiomerenüberschuß mit *Corynebacterium equi* und *Helminthosporium sp.*

c) Oxidative Dealkylierungen

P450-Enzyme katalysieren auch die oxidative O-, N- und S-Dealkylierung. Beispiele dieser wichtigen Reaktionen sind die O-Dealkylierung von Codein, Mescalol, Phenacetin, die N-Dealkylierung von Ephedrin, Methamphetamin, Aminopurin und die S-Dealkylierung von 6-Methylthiopurin zu 6-Methylpurin.

d) Oxidative Deaminierung

P450-Enzyme katalysieren auch die oxidative Deaminierung von Aminen. Diese Reaktion hat primär eine Entgiftungsfunktion für den Organismus. Histamin, Noradrenalin und Mescalol können unter anderem auf diese Weise deaminiert werden.

e) Oxidative Dehalogenierung

Viele halogenierte Alkane und Alkene bilden nach Hydroxylierung an einer -C-H Bindung ein instabiles Intermediat, das in ein Aldehyd oder Keton und H-Hal dissoziiert. Beispiele sind die Oxidation von Ethendibromid zu 2-Bromacetaldehyd und die Oxidation von Chloroform zu Phosgen. Mono- und dihalogeniertes Methan bildet im Vergleich zu dreifach halogeniertem Chloroform nur schwach zelltoxische Metabolite.

Eine mechanistische Beschreibung der vorgestellten P450-Reaktionstypen findet sich in dem Übersichtsartikel von Koymans et al., in *Xenobiotica*, (1993) 23 (6): 633.

In vivo/in vitro Nutzung von P450-Monooxygenasen zur Feinchemikaliensynthese

Im Gegensatz zur mikrobiellen Biotransformation beschränkt sich die Verwendung rekombinant exprimierter P450-Monooxygenasen zur Feinchemikaliensynthese trotz enormer Potentiale auf wenige in vivo Verfahren wie die Herstellung von Dicarbonsäure als Zwischenstufen für Geruchsstoffe, Steroiden wie Progesteron und subterminal hydroxylierter gesättigter und ungesättigter Fettsäuren als Vorstufen für Riechstoffe (Laktone), Polymere und Darreichungsformen für Medikamente.

Die Verwendung von P450 Monooxygenaseenzymen in vitro zur Feinchemikaliensynthese ist bisher noch nicht literaturbekannt. Um P450-Monooxygenasen zur Feinchemikaliensynthese zu verwenden, müssen Expressionssysteme vorhanden sein, die es erlauben, funktionell aktives P450 über Artgrenzen hinweg in hohen Ausbeuten zu exprimieren. Ferner muß das Enzym eine ausreichend hohe Aktivität und Stabilität (Temperaturstabilität, Lösungsmittelstabilität, Oxidationsstabilität) besitzen. Die produzierten Metabolite sollten für das Protein und den Wirt nicht toxisch sein. Für Klasse I und Klasse II sollte ferner ein geeignetes Cofaktor-Recyclingsystem vorhanden sein. Die vorliegende Erfindung schafft hierzu die Voraussetzungen.

Das P450 BM-3 Monooxygenasesystem

P450 BM-3 (CYP102) wurde erstmals im Jahre 1986 als dritte P450-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* in *E. coli* funktionell aktiv exprimiert und charakterisiert. Mit einem Molekulargewicht von 118 kDa war P450 BM-3 das erste bekannte wasserlösliche natürliche Fusionsprotein, das alle drei Domänen (FAD, FMN, P450) in einer einzigen Polypeptidkette enthält. Im Jahre 1993 gelang es, die P450-Domäne ohne Substrate (Ravichandran et al., *Science* (1993) 261, 731) und im Jahre 1997 mit Substrat (Li et al. *Nature Structural Biology* (1997), 4(2): 140) zu kristallisieren, P450 BM-3 dient aufgrund seiner Sequenzhomologie zu eukaryontischen P450 und mangels eukaryontischer P450-Kristallstrukturen als bevorzugtes Strukturmodell für diese P450-Enzyme.

P450 BM-3 ist eine Fettsäurehydroxylase, die Carbonsäuren, Alkohole, Amide, Alkylammoniumverbindungen ab Kettenlänge C12 bis zu C22 subterminal hydroxyliert. Die Regiospezifität der Hydroxylierung hängt, wie in Tabelle 2 gezeigt, stark von der Kettenlänge der Fettsäure ab.

Tabelle 2

Substrate	ω -Hydroxylierung [%]	ω -1 Hydroxylierung [%]	ω -2 Hydroxylierung [%]	ω -3 Hydroxylierung [%]
Laurinsäure (12:0)	-	48	26	26
Myristinsäure (14:0)	-	58	21	21
Palmitinsäure (16:0)	-	20	48	31

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren und die folgenden Ausführungsbeispiele, welche die Anwendung des erfindungsgemäßen Donorsystems auf die Hydroxylierung von Fettsäuren mit Hilfe von P450 Enzymen betreffen, näher erläutert. Dabei zeigt

- Fig. 1 das P450 BM3-Klonierungsschema am Beispiel von pCYTEXP1;
 Fig. 2 das Prinzip des erfindungsgemäßen spektroskopischen P450-Nachweises;
 Fig. 3 das Absorptionsspektrum für die Reduktion von Cobalt(III)sepulchrat mit Zn-Pulver in Tris/HCl, 0,2 M, pH 8,2; gepunktete Linie Co(III)sepulchrat oxidiert; durchgezogene Linie Zn/Co(III)sepulchrat reduziert;
 Fig. 4 die Absorptionsänderung bei Umsatz von 12-pNCA durch P450 BM-3 F87A mit Zn/Co(III)sepulchrat in Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2, 0,25 M KCl;
 Fig. 5 eine Skizze des Elektronentransferwegs von Zn/Co(III)sepulchrat auf P450 mit "shunt"-Reaktionsweg und pNCA als Substrat;
 Fig. 6 den Umsatz von 12-PCA durch P450 BM-3 F87A und Zn/Co(III)sepulchrat in Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2, 0,25 M KCl mit und ohne Zugabe von Katalase;
 Fig. 7 den Einfluß der Tris/HCl- und Kaliumphosphat-Puffermischung auf die Reduktion von p-Nitrophenolat in Gegenwart von P450 BM-3 F87A und Zn/Co(III)sepulchrat;
 Fig. 8 (A) 12-pNCA Umsatz durch P450 BM-3 F87A als Funktion der Co(III)sepulchrat-Konzentration; (B) den Einfluß von Co(III)sepulchrat auf die Aktivität von P450 BM-3 F87A in Gegenwart von Substrat;
 Fig. 9 den 12-pNCA Umsatz als Funktion der eingesetzten Zinkpulvermenge in Gegenwart von 0,5 mM Co(III)sepulchrat;
 Fig. 10 die P450 BM-3 F87A Restaktivität nach 5 min Inkubation bei verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen ohne Substrat.

Referenzbeispiel 1

Mikrobiologische Methoden

1. Mikroorganismen und Plasmide, Chemikalien und Enzyme

- Das Bakterium *Bacillus megaterium* wurde bei DSMZ-Stammsammlung (32^T, Braunschweig, Deutschland), die *E. coli*-Stämme DH5 α , JM105 und JM109 bei Clontech (Heidelberg, Deutschland) und XL1-Blue bei Stratagene (Heidelberg, Deutschland) erworben. Den Stamm W3110 erhielten wir vom Institut für Bioverfahrenstechnik (Stuttgart, Deutschland). Der *E. coli*-Stamm DH5 α (supE44, lacU169 [80lacZ M15] hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1) wurde, sofern nicht anders erwähnt, für die folgenden beschriebenen Klonierungsarbeiten verwendet. Als Plasmide fanden pCYTEXP1 mit dem temperaturindizierbaren P_{RP}L-Promotorsystem des Bakteriophagen λ (Belev T.N., et al., Plasmid (1991) 26: 147) und pASK-IBA1CA mit Tetrazyklin-Promotor (Schmidt, T. G. M., et al., J. Chromatogr. A (1994) 676: 337; Schmidt, T. G. M. et al., J. Mol. Biol. (1996) 255: 753) Verwendung. Die im Rahmen dieser Arbeit zur heterologen Expression von P450 BM-3 verwendeten Stämme und Plasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst, wobei pT die Herkunft der P450 BM-3 Konstrukte vom pCYTEXP1-Plasmid und pA die Herkunft vom pASK-IBA1CA-Plasmid kennzeichnet.

Tabelle 3

E.coli-Stamm/Plasmid-Insert-Konstrukt	exprimiertes Protein
DH5α/pT-USC0BM3, W3110/pT-USC0BM3	P450 BM-3
DH5α/pT-USC1BM3, JM105/pT-USC1BM3, JM109/pT-USC1BM3, W3110/pT-USC1BM3	P450 BM-3His ₆
DH5α/pT-USC1BM3F87A, JM105/pT-USC1BM3F87A, JM109/pT-USC1BM3F87A, W3110/pT-USC1BM3F87A XL1-Blue/pT-USC1BM3F87A	P450 BM-3His ₆ F87A Mutante
DH5α/pT-USC2BM3, W3110/pT-USC2BM3	P450 BM-3Glu ₆
DH5α/pT-USC3BM3, W3110/pT-USC3MB3	P450 BM-3Arg ₆
DH5α/pA-USC4BM3, JM105/pA-USC4BM3, JM109/pA-USC4BM3, W3110/pA-USC4BM3	P450 BM-3Strep

Sofern nichts anderes erwähnt ist, wurden alle Chemikalien von Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) und alle Enzyme von New England Biolabs (Beverly, USA) oder Boehringer Mannheim (Penzberg, Deutschland) bezogen.

2. Kulturmedien

Alle Komplexmedien stammen von Difco (Augsburg, Deutschland).

a) Nutrient-Medium (Vollmedium für Bacillus megaterium)

Peptone	5,0 g
Bacto beef	3,0 g
Bacto peptone	5,0 g
Agar	15 g (nur für Plattenkultur)
MnSO ₄ · H ₂ O	10 mg
H ₂ O	ad 1000 ml
Glycerinkultur	
Glycerin (86%)	500 µl
Kultur(OD ₅₇₈ : = 1,0)	500 µl

b) Luria-Bertani-Amp (LB-Amp, Vollmedium für E. coli)

Tryptone	10,0 g
NaCl	5,0 g
Yeast extract	5,0 g
Agar	20,0 g (nur für Plattenkultur)
Ampicillin	100 g/ml
H ₂ O	ad 1000 ml

3. Kultivierung der E. coli-Stämme und von Bacillus megaterium

a) Schüttelkolbenversuche

Die Kultivierung von Bacillus megaterium erfolgte im Nutrient-Medium bei 30°C, die rekombinanten E. coli-Stämme (DH5α, JM105, JM109, XL1-Blue, W3110) wurden in LB-Amp Medium bei 37°C kultiviert. Dazu wurde jeweils eine Kolonie mittels Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Amp überführt. Nach ca. 18 h Stunden Kultivierung bei 30°C (Bacillus megaterium) und 37°C (E. coli) bei einer Schüttelfrequenz von 220 Upm wurden 400 ml Medium in einem 2-l-Kolben mit 4 ml Kultur inokuliert. Die Induktion der P450-Expression in E. coli erfolgte nach Erreichen eines OD₅₇₈-Wertes zwischen 0,8 und 1,0 durch eine drei- bis vierstündige Hitzeschockinduktion bei 42°C im Falles der pT-Plasmid-Konstrukte oder durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (Endkonzentration 0,4 mg/l) beim pA-USC4BM3-Plasmid und einer 14-stündigen Inkubation bei 30°C.

b) 30-l-Batch-Fermentationen

Zur präparativen P450 BM-3 Produktion wurde die Expressionskassette pT-USC1BM3, der Wirt DH5 α und ein Bio-engineering Fermenter Typ LP351 bei einer Belüftung von 3,5 l/min. einer Rührgeschwindigkeit von 300 Upm bei 37°C in LB-Amp-Medium bei einem Start-pH-Wert von 7,5 eingesetzt. Um Schaumbildung zu vermeiden und Ausbeuten zu steigern wurden 2,0 ml steriles Contraspum 210 (Z. Schimmer & Schwarz, Lahnstein, Deutschland) und 0,1 mg/l FeCl₃ vor Inokulation dem LB-Amp-Medium zugegeben (Nishihara et al. 1997). Inokuliert wurde durch Zugabe zweier 400 ml Schüttelkolben-Kulturen (OD₅₇₈ = 0,8–1,0; Abschnitt a)).

Nach Erreichen eines OD₅₇₈-Wertes von 1,0 im Fermenter erfolgte die P450-Produktion mittels Hitzeschockinduktion durch Erhöhen der Temperatur für drei bis fünf Stunden von 37°C auf 42°C. P450 BM-3 oder die Mutante F87A wurden in E. coli DH5 α in Ausbeuten von 36 bis 48 mg/l Fermenterbrühe exprimiert. Die Aufkonzentrierung der E. coli Kultur von 30 Liter auf 2 Liter wurde durch Querstromfiltration mit einer Millipore Applikation (Eschborn, Deutschland) mit einer Filtron (Dreielch, Deutschland) Centrasette OMEGA (0,3 μ m) Membran durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 9200 g für 20 min wurden die Zellen in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) oder Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5) resuspendiert, in zwölf 50 ml Falcon-Tubes (Greiner) aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Referenzbeispiel 2

Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer wurden von ARK Scientific GmbH Biosystems (Düsseldorf, Deutschland) hergestellt. Nur die Primer für die Punktmutation und für die Isolierung des P450 BM-3 Gens aus der genomischen *Bacillus megaterium* DNA waren HPLC gereinigt.

a) Oligonukleotide für genomische *Bacillus megaterium*-DNA

B1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'
B2) 5'-GCCTCTTGGATCCTTACCCAGCCACACGTCCTTTGCG-3'

b) Primer für Sequenzierung

R0_5 5'-GTACGTGATTTTGCAGGAG-3'
R1 5'-GGCTATCATGCGATGATGGT-3'
R1_5 5'-CCCAGCTTATGATGAAAAC-3'
R2 5'-GGAAAAGATCCAGAAACGGG-3'
R2_5 5'-GTCGGCATGGTCTTAAACG-3'
R3 5'-ATTCCTCAGCTTCACCGTGA-3'
R3_5 5'-CTTGGCGGTATTCCTTCAC-3'
R4 5'-ATTTGCACCGCAGGTCGCAA-3'
R4_5 5'-CTGGGCTACTACGTATC-3'
R5 5'-TTCAATTTGTGACAGCGCC-3'
R5_5 5'-GAAGGAGATCATTTAGGTG-3'
R6 5'-TCGCGCAATGGCTGCTAAAA-3'
R6_5 5'-CGATTTCTTCATCACCTC-3'
R7 5'-CTGCCAAAAGACCCTGAAAC-3'
L1 5'-ACCATCATCGCATGATAGCC-3'
L2 5'-CCCGTTTCTGGATCTTTTCC-3'
L3 5'-TCACGGTGAAGCTGAGGAAT-3'
L4 5'-TTGCGACCTGCGGTGCAAAT-3'
L5 5'-GGCGCTGTCGACAAATTGAA-3'
L6 5'-TTTtagcagccattgCGCGA-3'
L7 5'-GTTTCAGGGTCTTTTGGCAG-3'

c) Oligonukleotide für Tags am C-Terminus

A1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'
 A2) 5'-CGGAATTCTTAACGACGACGACGACGACGCCAGCCACACG-3'
 G1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'
 G2) 5'-CGGAATTCTTATTCTTCTTCTTCTTCCCCAGCCACACG-3'
 H1) 5'-GTGAAAGAGGGATCCCATGACAATTAAAGAAATGCC-3'
 H2) 5'-CGCAATTCTTAATGATGATGATGATGATGCCAGCCACACG-3'
 S1) 5'-GTCTCAGCGTGAGACCCCGAGCCACACGTCTTTTGCC-3'
 S2) 5'-GTGAAAGAGGTCTCCAATGACAATTAAAGAAATGCC-3'

d) Primer für P450 BM-3 Punktmutante F87A

F87A1 5'-GCAGGAGACGGGTTGGCCACAAGCTGGACGCATG-3'
 F87A2 5'-CATGCGTCCAGCTTGTGGCCAACCCGTCTCCTGC-3'

Referenzbeispiel 3

Gentechnische Methoden

1. Isolierung und Präzipitation genomischer Bacillus-DNA und Plasmid-DNA aus E. coli

Zur Isolation der genomischen DNA aus *Bacillus megaterium* mittels Phenol-Chloroformextraktion wurde das Zellpellet aus 200 ml Kulturüberstand ($OD_{578} = 1,2$) in 20 ml Lysozymmix (18 mg Lysozym, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und bei 37°C und 30 Minuten lang bei 220 UpM geschüttelt. Nach Zugabe von 2 ml SDS (10% (m/v)) wurde weitere 60 Minuten bei 37°C und 220 UpM inkubiert. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde dreimal mit einer Mischung aus Chloroform/Isoamylalkohol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und einmal mit Phenol extrahiert. Die genomische DNA wird durch Zugabe von 10% (v/v) 3 M NaAc, pH 4,8 und 60% (v/v) Isopropanol gefällt, mittels Glasstab aufgerollt, in ein Corex-Röhrchen überführt und bei 32 570 g zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit 70% Ethanol wird die DNA am "Hausvakuum" getrocknet und in 3 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst. Die Reinheit der DNA wurde spektroskopisch durch Quotientenbildung von 260 nm zu 280 nm zu 2,2 bestimmt.

Die Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem auf alkalischer Lyse der Zellen basierenden QIAprep-Spin-Miniprep-Kit exakt nach den Angaben des Herstellers (Qiagen).

2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

a) PCR-Reaktion zur Isolierung des P450 BM-3 Gens aus genomischer *Bacillus megaterium*-DNA

PCR-Standardprotokoll

Wiederholungen des Programmschritts	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation/ DNA-Synthese
1 Mal	95°C, 7 min		
30 Mal	95°C, 1,5 min	50°C, 1,5 min	72°C, 2 min
1 Mal			72°C, 7 min

Standard-Ansatz

8 µl dNTP-Mix (200 µM), 10 µl Tag-Polymerase-Puffer (10 ×) ohne MgCl₂, 8 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl Primer B1 (0,1 µM), 1 µl Primer B2 (0,1 µM), 1 µl genomische *Bacillus megaterium*-DNA, 2,5 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), ad 100 µl demineralisiertes Wasser.

b) Einfügen von Tag-Sequenzen am C-Terminus

Um die Proteinreinigung zu vereinfachen und eine gerichtete Immobilisierung von P450 BM-3 zu ermöglichen wurde ein jeweils sechs Aminosäuren langer C-terminaler-Tag an das P450 BM-3 Gen angefügt. Als Templat fungierte genom-

ische *Bacillus megaterium*-DNA. Als überhängende Restriktionsenden wurden für die His-, Arg- und Glu-Tags BamHI und EcoRI gewählt, um anschließend die modifizierten P450-BM-3-Gene in das Plasmid pCYTEXP1 zu klonieren. Für den Strep-Tag wurden für das 5'- und 3'-Ende BsaI gewählt; dies ermöglicht eine Klonierung in das Plasmid pASK-IBAICA. BsaI schneidet erst nach der Erkennungssequenz, wodurch die überhängenden Restriktionsenden eine unterschiedliche Sequenz aufweisen und somit eine gerichtete Ligation erlauben.

Für die PCR-Reaktionen wurden das Standard-PCR Programm und der Standard-Ansatz verwendet. Im Unterschied zum Standard-Ansatz wurden für den His₆-Tag die Primer H1 und H2, für den Arg₆-Tag die Primer A1 und A2, für den Glu₆-Tag die Primer G1 und G2 sowie für den Strep-Tag die Primer S1 und S2 verwendet.

3. Restriktionsspaltung, Elektrophoretische Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA sequenzspezifisch. Die Restriktionsspaltung von DNA erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 10 µl in Gegenwart von 2–3 µl nach DNA (Spin-Präp (Qiagen)), 1–2 U Restriktionsenzym, 1 µl Restriktionspuffer (10x) und ad 10 µl ddH₂O durch ein- bis zweistündige Inkubation der Reaktionslösung bei 37°C (außer BsaI) entsprechend der Herstellervorschrift. Die Reinigung der DNA-Fragmente wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese nach der Vorschrift von (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8–2%ige Agarosegele verwendet. Als Elektrophorese-Puffer diente TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3). Angelegt wurde aufgrund der Wärmeentwicklung bei bis zu einprozentigen Agarose-Gelen eine Spannung von 120 V und bei bis zu zweiprozentigen Agarose-Gelen von 100 V. Interkalierendes Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,25 µM) wurde zur Visualisierung der DNA im UV-Durchlicht eines Transilluminators (312 nm) verwendet.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des QIAquick Gel Extraktion Kits (Qiagen) durchgeführt. Dabei wird die DNA durch Binden an eine Silika-Gel enthaltene Säule immobilisiert und mittels verschiedener Waschschrte von Verunreinigungen befreit. Durch anschließende Elution mit demineralisiertem Wasser können mit dieser Methode bis zu 8 µg DNA (100 bp–10 kb) erhalten werden.

4. Ligation und Transformation in *E. coli*

Zur Ligation von DNA wurde die T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Beverly, USA) verwendet, die die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden der DNA katalysiert und somit zwei lineare DNA-Moleküle verbindet oder die Zyklisierung eines linearen Moleküls ermöglicht.

Zur Ligation wurden Agarose-Gel gereinigte Vektor- und Insertfragmente (vergleiche Punkt 3) im molaren Verhältnis 1 zu 3 bis 1 zu 5 zugunsten des Inserts in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Vor Zugabe von 2 µl Ligase-Puffer (10x) und 2–10 U T4-DNA-Ligase wurde demineralisiertes Wasser hinzugefügt (Gesamtvolumen 20 µl). Die Reaktionsansätze wurden eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 7°C inkubiert.

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation wurden 500 µl einer *E. coli*-Übernachtskultur zum Animpfen eines 250 ml-Schüttelkolbens, der 50 ml LB-Medium enthielt, verwendet. Nach ca. dreistündiger Inkubation bei 37°C und 220 UpM, wird die Kultur nach Erreichen eines OD₆₀₀-Wertes zwischen 0,4–0,6 bei 5500 g 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 2 ml TSS-Puffer (10 g PEG6000, 5 ml DMSO, 0,6 g MgSO₄, ad 100 ml LH) resuspendiert, auf Eis inkubiert und in 200 µl Aliquots aufgeteilt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei –80°C gelagert.

Zur Transformation werden zu 200 µl der kompetenten Zellen 5 bis 25 µl des Ligationsansatzes gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wird der Transformationsansatz 30 s bei 42°C im Thermomixer inkubiert und 800 µl auf 37°C erwärmtes LB-Medium zugegeben. Die Ansätze werden eine Stunde lang im Inkubator bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend bei 5500 g zentrifugiert (3 Minuten), im rücklaufenden Tropfen LB-Medium aufgenommen und auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Über Nacht wurden die Agarplatten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

5. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde unter Verwendung des Applied Biosystems DNA Sequenzierautomats 373A und des Dye Terminator Cycle Sequencing-Kits mit AmpliTaq-DNA-Polymerase durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxy-Methode von Sanger, jedoch werden statt radioaktiv markierter dNTPs, dNTPs mit Fluoreszenzmarkern eingesetzt, die im Verlauf der Sequenzierreaktion in die synthetisierten DNA-Fragmente eingebaut werden.

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mit 100-prozentigem auf –20°C gekühltem Ethanol gefällt. Nach Trocknung der DNA und Aufnahme in 4 µl einer 5 : 1-Mischung aus Formamid und 25 mM EDTA, pH 8,0 erfolgte die Denaturierung eines jeden PCR-Ansatzes bei 95°C für 5 Minuten und sofortiger Überführung der Proben auf Eis.

Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Fragmente durchlaufen während der Gelelektrophorese einen Laserstrahl. Das senkrecht zu diesem Strahl emittierte Fluoreszenzlicht wird von Fotodioden hinter dem Gel gemessen und von der Software in ein Kurvendiagramm umgewandelt.

Sequenzier-Ansatz

8 µl Terminator Ready Reaction Mix; 3,2 µmol Primer; 300–500 ng Template DNA;
H₂O ad 20 µl.

PCR-Programm

Wiederholungen des Programm- schritts	Denaturier- ung	DNA- Annealing	Elongation/ DNA- Synthese
1 Mal	96°C, 6 min		
25 Mal	96°C, 40 s	50°C, 30 s	60°C, 4 min
1 Mal			60°C, 4 min

Sequenzier-Gel-Zusammensetzung

Harnstoff 30 g (Roth); Rotiphorese NF-10x-TBE-Puffer 6 ml (Roth); Acrylamid/Bis-Lösung 40% (29 : 1) 9 ml (Roth); ddH₂O demineralisiert 23,5 ml.

Die fertige Lösung wird filtriert und entgast. Die Polymerisation wird durch Zugabe von 24 µl TEMED und 180 µl 10% (m/v) APS gestartet. Für Einzelheiten dazu, zur Auswertung der Sequenzdaten und zu den dNTP-Markierungen, sei auf das Handbuch zum Sequenzierautomaten verwiesen.

6. Punktmutation F87A mittels OuikChange Kit (Stratagene)

Zur Erhöhung der Sensitivität des pNCA-Assaysystems, wurde an Position 87 die Aminosäure Phenylalanin durch ein Alanin ersetzt. Um die Punktmutante leichter identifizieren zu können, wurde, ohne weitere Änderung der Aminosäuresequenz, eine zusätzliche EaeI-Restriktionsschnittstelle unter Einbeziehung der Mutationsposition, eingefügt.

Im Gegensatz zum Standard-PCR-Programm erfolgte hierbei nur eine vierminütige DNA-Denaturierung und der Sequenzierreaktionsschritt wurde bei einer Annealing-Temperatur von 52,3°C, und 17-minütigem Elongationsschritt nur 16 Mal durchlaufen. Auf den dritten Programmschritt wurde verzichtet.

Ansatz für PCR

1,2 µl dNTP-Mix (200 µM), 5 µl Pfu-Polymerase-Puffer (10x), 2,5 U Pfu-Polymerase, 2,5 µl Primer F87A1 (5 nM), 2,5 µl Primer F87A2 (5 nM), 1 µl pT-USC1BM3 (aus Mini-Präparation 1 : 20 mit demineralisiertem Wasser verdünnt), ad 50 µl demineralisiertes Wasser.

Die "Annealing"-Temperatur von 52,3°C zeigte nach obiger PCR-Reaktion auf einem einprozentigen Agarose-Gel eine scharfe Bande mit erwarteter Fragmentgröße.

Nach Abtrennen des Mineralöls vom Reaktionsgemisch wurde der PCR-Ansatz mit 1 µl DpnI (10 U/µl) versetzt und die Lösung vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Es wurde kurz zentrifugiert und inkubiert bei 37°C für eine Stunde. Während des Verdauens wurden die ultrakompetenten E. coli XL1-Blue auf Eis aufgetaut und in 50 µl Aliquots auf 15 ml Falcon-Tubes verteilt. Nach Zugabe von 1 µl β-Mercaptoethanol, 4 µl Zugabe des verdauten PCR-Reaktionsansatzes und 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein 30 s langer Hitzeschock bei 42°C und eine zweiminütige Abkühlung auf Eis. Zum Transformationsansatz wurden 450 µl erwärmtes (Ölbadtemperatur 42°C) NZY-Medium (12 g NZamine, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7,5) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 220 UpM und Zentrifugation (5500 g, 3 min) wurde das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

Referenzbeispiel 4

Präparative Methoden

1. Zellaufschluß

Zellpellets mit einer Biofeuchtmasse von bis zu 15 g E. coli DHSa/pT-USC1BM-3 oder DH5α/pT-USC1BM-3F87A wurden auf Eis aufgetaut und in 25 ml Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) oder Tris/HCl Puffer (50 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA) suspendiert. Mittels dreiminütiger Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier W250, (Dietzenbach, Deutschland), Leistungsabgabe 80 W, Arbeitsintervall 20%) wurde die auf Eis gekühlte E. coli-Zellsuspension aufgeschlossen. Vor der Proteinreinigung wurde die Zellsuspension für 20 min bei 32° 500 g zentrifugiert und durch einen 0,22 µm Sterivex-GP-Filter (Millipore) filtriert. Diese klare Lösung wird im folgenden als Rohextrakt bezeichnet.

2. Chromatographische P450 BM-3-Reinigungsmittels Anionenaustauschern

Zur Proteinreinigung wurde ein ÄKTAexplorer System (Amersham Pharmacia Biotech) mit einer auf Personal-Computern basierenden OS/2-UNICORN Steuersoftware v2.1 und einem Frac-900 Fraktionssammler verwendet, das die

gleichzeitige Messung der Gesamtproteinelution bei 280 nm und P450 BM-3 Elution bei 417 nm erlaubt.

Alle analytischen P450 BM-3 Proteinreinigungen mittels Anionenaustauscherchromatographie wurden bei 200 cm/h, Raumtemperatur und einer Beladung von 6–10 mg P450 BM-3 pro 100 ml Matrix durchgeführt. Alle Chromatographiematerialien wurden von TosoHaas (Stuttgart, Deutschland) bezogen.

a) Packung und Charakterisierung der Chromatographiesäulen

Zur Entwicklung eines P450 BM-3 Reinigungsprotokolls wurden vom Hersteller gepackte MPD-DEAE 650S (7,5 mm × 85 mm, Partikeldurchmesser 35 µm, Af = 1,1, 4100 TP/m) und selbst gepackte XK16/20 (16 mm × 100 mm, APB) Chromatographiesäulen verwendet, die Toyopearl DEAE 650M (Af = 1,1, 1610 TP/m), SuperQ 650M, (Af = 1,2, 1840 TP/m) und QAE 550M (Af = 1,0, 1780 TP/m) mit einem Partikeldurchmesser von 65 µm enthielten. Für die präparativen Chromatographiereinigungen wurde eine INDEX200 (APB) Glassäule (20 cm × 19 cm, Af = 1,4, 3800 TP/m), sechs Liter Toyopearl DEAE 650M und eine Zahnradpumpe (ISMATEC, PB, USA) benutzt. Im Gegensatz zu den analytischen P450 BM-3 Chromatographiereinigungen wurde das ÄKTAexplorer System über einen 1/20 aufgeteilten Fluß als Monitor verwendet, und die Puffer vor den präparativen Reinigungen manuell hergestellt. Die Puffer bestanden aus Tris/HCl (0,1 M, pH 7,8) mit 1 mM EDTA sowie 150 mM NaCl für die erste, 250 mM NaCl für die zweite und 1 M NaCl für die dritte Salzstufe.

b) Wahl der pH-, Elutions- und Pufferbedingungen

Voruntersuchungen auf der Grundlage von Aktivitätsmessungen über NADPH-Verbrauch ergaben einen geeigneten pH-Bereich zwischen 6,8 und 8,0 zur P450 BM-3 Reinigung. Spätere Untersuchungen zur pH-Stabilität mit dem pNCA-Nachweissystem bestätigten diesen pH-Bereich.

Anionenaustauscherchromatographien mit linearen NaCl-Gradienten zeigten, daß ein Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,8) mit 1 mM EDTA einem Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0 bis pH 7,5) mit 1 mM EDTA in Bezug auf Bindungskapazität und Auflösungsvermögen für P450 BM-3 deutlich überlegen ist. Aus diesen Gründen wurde das Tris/HCl-Puffersystem für alle weiteren Reinigungsoptimierungen verwendet.

3. Immobilisierung der P450 BM-3 F87A Mutante

a) Vorexperimente zur Auswahl der Trägermaterialien

Zur Immobilisierung von P450 BM-3 F87A wurden in Vorexperimenten verschiedene adsorptive und kovalente Methoden untersucht. Für alle Vorexperimente wurden 100 mg Trägermaterial (Ausnahme: EP-100, 50 mg) und 5 nmol P450 BM-3 F87A (aus Rohextrakt) verwendet.

Zur Auswahl eines geeigneten Trägermaterials wurde bei den adsorptiven Methoden 5 nmol P450 BM-3 F87A zur KXP04-Puffer-(20 mM, pH 7,5, ad 1600 µl) Trägermaterial-Suspension in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden nach Anbringen mittels Klebeband an die Außenseite eines 250 ml Rundkolbens eine Stunde am Rotationsverdampfer langsam zur Proteinimmobilisation über Kopf gedreht. Zur Bestimmung der Adsorptionskapazitäten wurden die Immobilisate eine Minute bei 9000 g zentrifugiert und 200 µl des Überstandes zur Aktivitätsmessung entnommen.

b) Optimierte Immobilisierungsvorschrift für DEAE 650M und Super Q650M

Bis zu 81 nmol eines P450 BM-3 F87A-Rohextrakts oder Lyophilisats können pro ml sedimentiertem DEAE 650M Adsorptionsmaterial in 5 ml Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) immobilisiert werden. Bei dem SuperQ 650M Adsorptionsmaterial sind es bis zu 102 nmol eines P450 BM-3 F87A-Rohextrakts. Zur Immobilisierung wurde das Lyophilisat in 4 ml dH₂O in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß aufgenommen und mit einer Endkonzentration von 0,1 mM 12-pNCA versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 ml der mit 5 ml Wasser zweimal gewaschenen und zentrifugierten (9000 g, 1 min) Adsorptionsmatrix zugegeben und eine halbe Stunde analog zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen über Kopf gedreht. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Immobilisat mit 5 ml Tris/HCl-Puffer (pH 7,5, 0,02 mM) versetzt, vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert (9000 g, 1 min). Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Nach Zugabe von Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,5) auf ein Endvolumen von 2,0 ml zum Immobilisat wurde dieses resuspendiert und in 200 µl Aliquots auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die bereits 495 µl dieses Puffers enthielten. Nach Zugabe von 5 µl 12-pNCA (15 mM) und fünfminütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion in einer Eppendorf-Schüttelapparatur (Ika-Vibrax, mit Janke und Kunkel Aufsatz VX2E) durch Zugabe von 100 µl NADPH (1 mM) gestartet und nach variierten Reaktionszeiten mit 100 µl 6 M KOH gestoppt. Nach Zentrifugation bei 9000 g (1 min) wurde der Überstand abgenommen und die Absorption bei 410 nm bestimmt.

Zur kovalenten Immobilisierung von P450 BM-3 F87A mittels Glutardialdehyd wurde P450 BM-3 F87A in einem 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) aufgeschlossen. 5 g aminomodifizierter Trisopor-Gläser (Schueller, i 500–800 µm) wurden bei Raumtemperatur zwischen drei und zwölf Stunden in einer geschlossenen Apparatur mit Glutardialdehyd bedampft. Die mit Glutardialdehyd aminomodifizierten Gläser zeigten eine rotviolette Farbe, die auch nach zweimaligem Waschen mit 100 ml Kaliumcarbonatlösung (50 mM, pH 7,8) über eine Fritte erhalten bleibt. Zwischen 50–150 mg dieser rot-violetten Gläser wurden mit 0,5–0,8 nmol P450 BM-3 F87A versetzt und bis zur Entfärbung der Lösung in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen in der Retsch-Kugelmühle bei niedrigster Stufe und 6°C eine Stunde lang geschüttelt.

4. Enzym-Membranreaktor

Zur Überprüfung des Enzym-Membran-Reaktorkonzepts wurden 25 nmol P450 BM-3 F87A auf 4 ml SuperQ 650M immobilisiert und in das Reaktorreaktionsgefäß zu 200 ml Tris/HCl Puffer (pH 7,8) gegeben. Nach Zugabe von 1,2 µmol 12-pNCA bei einer Flußgeschwindigkeit von 40 ml/min wurde die Lösung 20 Minuten lang ohne Gegendruck auf das Filtrationsmodul durchmischt. Bei einem Gegendruck von 2 psi wurde durch Zugabe von 2 ml wäßriger NADPH-Lösung (1 mM) die Reaktion gestartet und der Reaktionsablauf durch die Bestimmung der Wellenlängen bei 410 nm verfolgt. Während des Reaktionsablaufs wurde NADPH-Lösung in 1 ml Schritten bis zur vollständigen 12-pNCA-Umsetzung zugegeben.

Referenzbeispiel 5

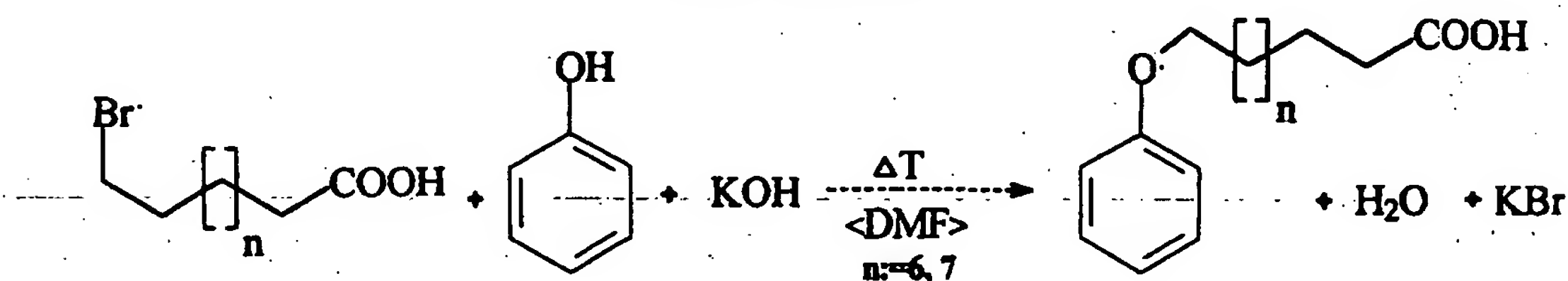
Chemische Synthesen

Alle ^1H -NMR-Spektren wurden mit einem 500 MHz-NMR-Gerät, alle ^{13}C -NMR mit einem 125 MHz-NMR-Gerät und CDCl_3 als Lösungsmittel aufgenommen.

1. Herstellung von ω -Phenoxycarbonsäuren (PCA)

Reaktionsschema A zeigt zur direkten PCA-Synthese aus ω -Bromocarbonsäuren.

Reaktionsschema A



Ansätze

1,01	g	(3,77 mmol)	Bromundekansäure oder
1,05	g	(3,77 mmol)	Bromdodekansäure
355	mg	(3,77 mmol)	Phenol
417	mg	(7,44 mmol)	Kaliumhydroxid
50	ml		DMF

Allgemeine Reaktionsvorschrift

Zur in DMF gelösten Bromfettsäure gibt man Phenol und Kaliumhydroxid. Die Lösung wurde unter Rückfluß 6–7 Stunden lang auf 160°C erhitzt und die Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie (DC, Laufmittel Petrolether : Diethylether 1 : 1) verfolgt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der braune Niederschlag in einem Wasser-Diethylether-Zweiphasensystem (1 : 1) gelöst und mit verdünnter Salzsäure wurde ein pH-Wert von 2 eingestellt. Nach Extraktion der wäßrigen Phase mit Diethylether wurden am Rotationsverdampfer die vereinigten Diethyletherfraktionen vom Lösungsmittel befreit, in Petrolether : Essigsäureethylester 1 : 1 aufgenommen und mittels einer DC60-Kieselgelchromatographiesäule (Merck) und dem gleichen Laufmittelgemisch gereinigt.

Charakterisierung

ω -Phenoxydodekansäure (12-PCA): Ausbeute: 76%; m_p : = 98–99°C
berechnet: C 73,93%, H 9,65%, O 16,41%,
gefunden: C 73,92%, H 9,67%

^1H -NMR: δ : = 7,26–7,29 (m, 2H, Phenyl-), 6,88–6,94 (m, 3H, Phenyl), 3,94 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂, J = 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,5 Hz), 1,74–1,80 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂), 1,59–1,66 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,42–1,48 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂), 1,29–1,35 (m, 12 H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-).
 ^{13}C -NMR: δ : = 180,4 (-COO), 159,3 (C-1'), 129,8 (C-3'), 120,8 (C-4'), 114,7 (C-2'), 68,3 (-O-CH₂-), 34,5 (-CH₂-COO-), 29,9, 29,8, 29,7, 29,7, 29,5, 29,4, 29,1, 26,5, 25,1 (C-3-C-11).

ω -Phenoxundekansäure (11-PCA): Ausbeute: 78%; m_p : = 95°C
berechnet: C 73,35, H 9,41%, O 17,24%;
gefunden: C 73,32%, H 9,44%

^1H -NMR: δ : = 7,18–7,21 (m, 2H, Phenyl-), 6,81–6,86 (m, 3H, Phenyl), 3,87 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂, J = 6,5 Hz), 2,27 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,5 Hz), 1,67–1,73 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂), 1,53–1,57 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,35–1,39 (m, 2H, -

O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,18-1,30 (m, 10H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₂-).
¹³CNMR: δ: = 180,5 (-COO), 159,5 (C-1'), 129,8 (C-3'), 120,7 (C-4'), 114,7 (C-2'), 68,2 (-O-CH₂-), 34,5 (-CH₂-COO-), 29,9, 29,7, 29,7, 29,7, 29,6, 29,4, 26,4, 25,0 (C-3-C-10).

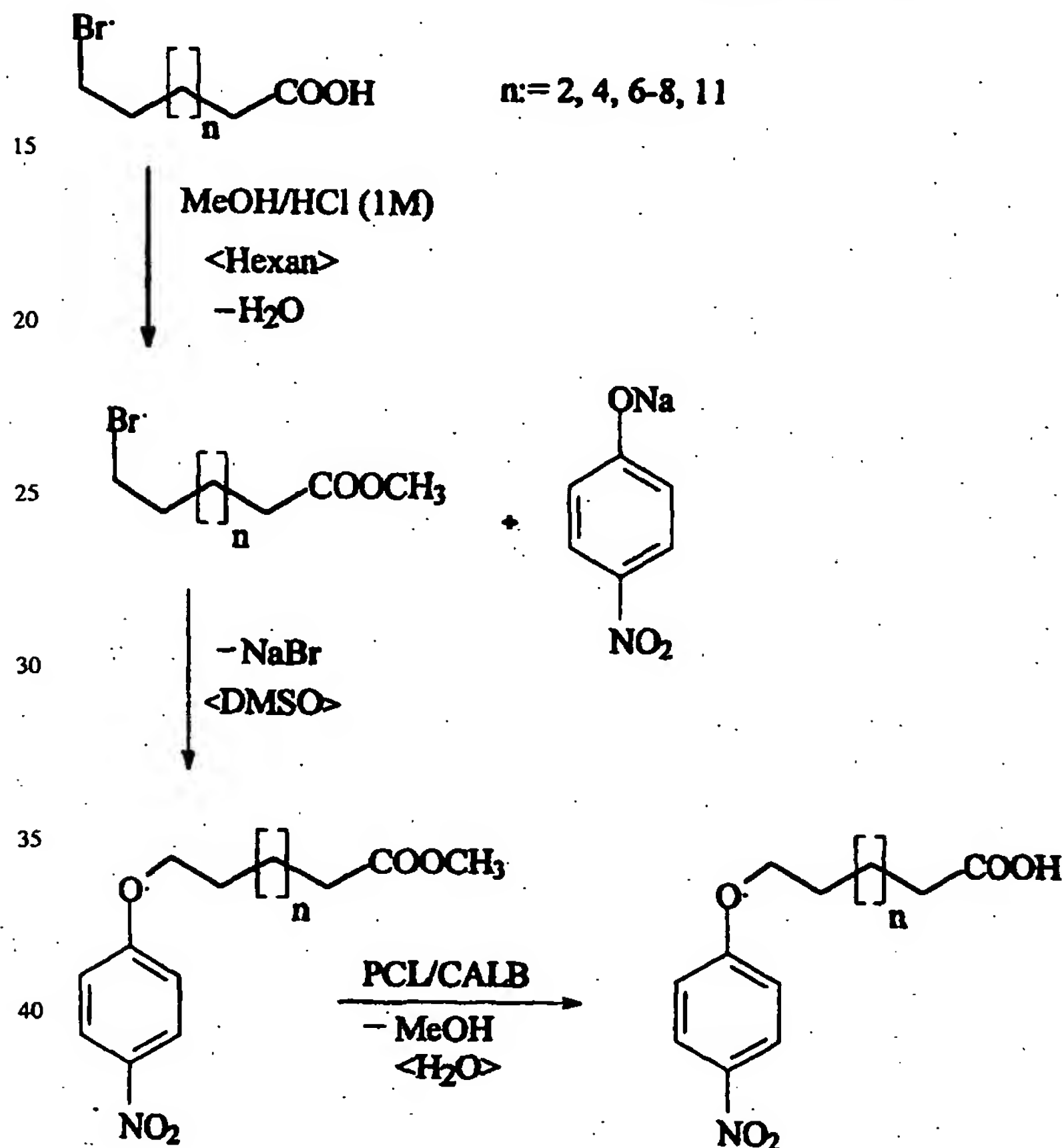
5

2. Herstellung von p-Nitrophenoxy-carbonsäuren (pNCA)

Im Gegensatz zu den PCA-Synthesen war eine entsprechende Synthese der pNCA-Verbindungen nicht möglich. Die pNCA-Synthese gelang erst, nachdem die ω-Bromcarbonsäuren verestert waren und wasserfrei gearbeitet wurde.

10

Reaktionsschema B



Allgemeine Vorschrift zur Synthese

Ausgehend von ω-Bromcarbonsäuren, wurden ω-Bromcarbonsäuremethylester und ω-Brom-carbonsäureethylester in Hexan entsprechend einer Standardmethode (Becker et al. 1993) mit wasserfreier Methanol- oder Ethanol-lösung, die 1 M HCl enthält, verestert. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC (Laufmittel Hexan : Diethylether : Essigsäure 70 : 30 : 1) verfolgt. Die wäßrige Phase wird zwei Mal mit Diethylether extrahiert, zwei Mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit demineralisiertem Wasser gewaschen, über Nacht mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und chromatographisch aufgereinigt, wobei als Laufmittel Petrolether : Diethylether im Verhältnis 70 : 30 verwendet wird. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer evaporiert war, wurden die Ester eine Stunde lang ans Hochvakuum angeschlossen, um die p-NCAester darzustellen wurde zu 17 mmol ω-Brom-carbonsäure-ester, die in 100 ml DMSO gelöst wurden, ein geringer Überschuß von 18,5 nmol p-Nitrophenol gegeben. Die Lösung wurde unter Rückflußkühlung für zwei bis drei Stunden auf 120°C erhitzt. Nach Abkühlen der leicht bräunlichen Lösung auf Raumtemperatur wurde tropfenweise demineralisiertes Wasser zugegeben, um die pNCAester auszufällen. Das Präzipitat wurde filtriert, mit 1,5 Liter eiskaltem Wasser zur Entfernung von überschüssigem p-Nitrophenol gewaschen und in DMSO zu einem weißen Pulver umkristallisiert. Zur Hydrolyse der pNCAester wurde eine Lipasemischung, bestehend aus 100 mg Pseudomonas cepacia (PCL) und 100 mg Candida antarctica Lipase B von Amano (Nagoya, Japan), zu einer 100 ml Aceton/Wasser Mischung (pH 7,5, 0,2 Kaliumphosphat, bis zu 50% Aceton) zugegeben. Nach Zugabe der pNCAester (5 mmol) wurde die Suspension bei Raumtemperatur bis zu 16 h gerührt. Zur Entfernung des Lipaseimmobilisats wurde die klare Suspension filtriert und die pNCAs durch Evaporierung von Aceton kristallisiert. Die pNCA-Verbindungen wurden mit kaltem Wasser gewaschen, in DMSO umkristallisiert und chromatographisch über Silicagel DC60 (Merck, Darmstadt) (Petrolether: Essigsäureethylester 1 : 1 bis 1 : 3) gereinigt.

Die angegebenen Ausbeuten der pNCA beziehen sich immer auf die entsprechenden pNCAester als Edukte, und die Ausbeuten für die pNCAester beziehen sich immer auf die zugehörigen ω -Bromcarbonsäuren.

p-Nitrophenoxyhexansäure (6-pNCA): Ausbeute: 81%; $m_p = 94^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,18 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,3$ Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3$ Hz), 4,06 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,3$ Hz), 2,42 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,1$ Hz), 1,80–1,92 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,68–1,77 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,49–1,61 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 180,0 ($-\text{COOH}$), 164,1 (C-4'), 141,4 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,5 ($-\text{O-CH}_2$ -), 33,9 ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$), 28,6, 25,5, 24,3 (C-3, C-5, C-4).

p-Nitrophenoxyhexansäureethylester (6-pNCAEt): Ausbeute: 81%

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,09 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,3$ Hz), 6,85 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3$ Hz), 4,05 (q, 2H, $-\text{COO-CH}_2$ -), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,4$ Hz), 2,26 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,3$ Hz), 1,69–1,82 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,57–1,67 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,40–1,50 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,17 (t, 3H, $-\text{COOCH}_2\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 173,7 ($-\text{COO}$), 164,3 (C-4'), 141,5 (C-1'), 126,0 (C-2'), 114,6 (C-3'), 68,7 ($-\text{O-CH}_2$ -), 60,4 ($-\text{COO-CH}_2$ -), 34,3 ($-\text{CH}_2\text{-COO}$ -), 28,8, 25,7, 24,8 (C-3, C-5, C-4), 14,4 ($-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$).

p-Nitrophenoxyoktansäure (8-pNCA): Ausbeute: 92%; $m_p = 98^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,11 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,2$ Hz), 6,86 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3$ Hz), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,4$ Hz), 2,29 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,4$ Hz), 1,69–1,80 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,56–1,61 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,32–1,43 (m, 6H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-CH}_2$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 180,2 ($-\text{COOH}$), 164,3 (C-4'), 141,4 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,8 ($-\text{O-CH}_2$ -), 34,0 ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$), 28,9, 28,9, 28,9, 25,8, 24,6 (C-3-C-7).

p-Nitrophenoxyoktansäuremethylester (8-pNCAMe): Ausbeute: 79 %

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,10 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,2$ Hz), 6,86 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3$ Hz), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,5$ Hz), 3,59 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 2,24 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,4$ Hz), 1,69–1,77 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,51–1,59 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,27–1,43 (m, 6H, $-\text{O-(CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_3$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 174,2 ($-\text{COO}$), 164,3 (C-4'), 141,4 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,8 ($-\text{O-CH}_2$ -), 51,5 ($-\text{COO-CH}_3$), 34,0 ($-\text{CH}_2\text{-COO}$ -), 29,0, 28,9, 28,9, 25,8, 24,9 (C-3-C-7).

p-Nitrophenoxydekansäure (10-pNCA): Ausbeute: 84%; $m_p = 101^\circ\text{C}$ $^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,18 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,2$ Hz), 6,93 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3$ Hz), 4,03 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,5$ Hz), 2,35 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,4$ Hz), 1,75–1,86 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,60–1,63 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,32–1,45 (m, 10H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-CH}_2$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 180,4 ($-\text{COO}$), 164,4 (C-4'), 141,5 (C-1'), 126,1 (C-2'), 114,6 (C-3'), 69,1 ($-\text{O-CH}_2$ -), 34,2 ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$), 29,9, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 26,3, 26,1, 24,8 (C-3-C-9).

p-Nitrophenoxydekansäuremethylester (10-pNCAMe): Ausbeute: 73%

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,11 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,2$ Hz), 6,86 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3$ Hz), 3,97 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,5$ Hz), 3,59 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 2,23 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,5$ Hz), 1,68–1,77 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,52–1,57 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,22–1,45 (m, 10H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-CH}_2$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 174,2 ($-\text{COO}$), 164,2 (C-4'), 141,2 (C-1'), 125,8 (C-2'), 114,3 (C-3'), 68,8 ($-\text{O-CH}_2$ -), 51,3 ($-\text{COOCH}_3$), 34,3 ($-\text{CH}_2\text{-COO}$ -), 29,2, 29,1, 29,1, 29,0, 28,9, 25,8, 24,8 (C-3-C-9).

p-Nitrophenoxyundekansäure (11-pNCA): Ausbeute: 89%; $m_p = 102^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,19 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,2$ Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,1$ Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,5$ Hz), 2,35 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,6$ Hz), 1,79–1,84 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,61–1,66 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,43–1,49 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,32–1,45 (m, 10H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-CH}_2$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 180,12 ($-\text{COO}$), 164,3 (C-4'), 141,3 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,9 ($-\text{O-CH}_2$ -), 34,0 ($-\text{CH}_2\text{-COO}$ -), 29,4, 29,3, 29,3, 29,2, 29,0, 29,0, 25,9, 24,6 (C-3-C-10).

p-Nitrophenoxyundekansäuremethylester (11-pNCAMe): Ausbeute: 80 %

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,18 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,3$ Hz), 6,93 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,2$ Hz), 4,03 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,5$ Hz), 3,66 (s, 3H, $-\text{COOCH}_3$), 2,29 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,5$ Hz), 1,75–1,86 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,58–1,64 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,29–1,45 (m, 12H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_6\text{-CH}_2$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 174,5 ($-\text{COO}$), 164,4 (C-4'), 141,5 (C-1'), 126,1 (C-2'), 114,6 (C-3'), 69,0 ($-\text{O-CH}_2$ -), 51,6 ($-\text{COOCH}_3$), 34,2 ($-\text{CH}_2\text{-COO}$ -), 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,1, 26,1, 25,1 (C-3-C-10).

p-Nitrophenoxydodekansäure (12-pNCA): Ausbeute: 89%; $m_p = 106^\circ\text{C}$

berechnet: C 64,07% H 8,07% N 4,06%, O 23,71%,

gefunden: C 63,99% H 8,18% N 4,15%

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,19 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,3$ Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,4$ Hz), 4,04 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,6$ Hz), 2,35 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,5$ Hz), 1,79–1,84 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,60–1,66 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,43–1,49 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,29–1,35 (m, 12H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_6\text{-CH}_2$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 180,4 ($-\text{COO}$), 164,3 (C-4'), 141,3 (C-1'), 125,9 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,9 ($-\text{O-CH}_2$ -), 34,1 ($-\text{CH}_2\text{-COO}$ -), 29,5, 29,4, 29,3, 29,2, 29,2, 29,0, 29,0, 25,9, 24,7 (C-3-C-11).

p-Nitrophenoxydodekansäureethylester (12-pNCAEt): Ausbeute: 73% $^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,18 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,2$ Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3$ Hz), 4,12 (q, 2H, $-\text{COO-CH}_2$ -, $J = 7,1$ Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, $J = 6,5$ Hz), 2,29 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COO}$, $J = 7,5$ Hz), 1,70–1,87 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,59–1,69 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1,32–1,45 (m, 14H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-CH}_2$ -), 1,26 (t, 3H, $-\text{COOCH}_2\text{-CH}_3$, $J = 7,2$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 174,8 ($-\text{COO}$), 164,4 (C-4'), 141,5 (C-1'), 126,1 (C-2'), 114,6 (C-3'), 69,0 ($-\text{O-CH}_2$ -), 60,5 ($-\text{COO-CH}_2$ -), 34,2 ($-\text{CH}_2\text{-COO}$ -), 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 29,1, 26,1, 25,1 (C-3-C-11), 14,4 ($-\text{COO-CH}_2\text{-CH}_3$).

p-Nitrophenoxypentadekansäure (15-pNCA): Ausbeute: 87%; $m_p = 115^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 8,19 (d, 2H, NO_2 -Phenyl-, $J = 9,2$ Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, $J = 9,3$ Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O- CH_2 -, J

= 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,5 Hz), 1,79–1,85 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,59–1,66 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,43–1,49 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,26–1,35 (m, 18H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₉-CH₂-).

¹³C-NMR: δ = 180,0 (-COO), 164,3 (C-4'), 141,3 (C-1'), 126,0 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,9 (-O-CH₂-), 34,0 (-CH₂-COO-), 29,6, 29,6, 29,5, 29,4, 29,4, 29,3, 29,3, 29,2, 29,1, 29,0, 25,9, 24,7 (C-3-C-14).

5 p-Nitrophenoxypentadekansäuremethylester (15-pNCAME): Ausbeute: 75%

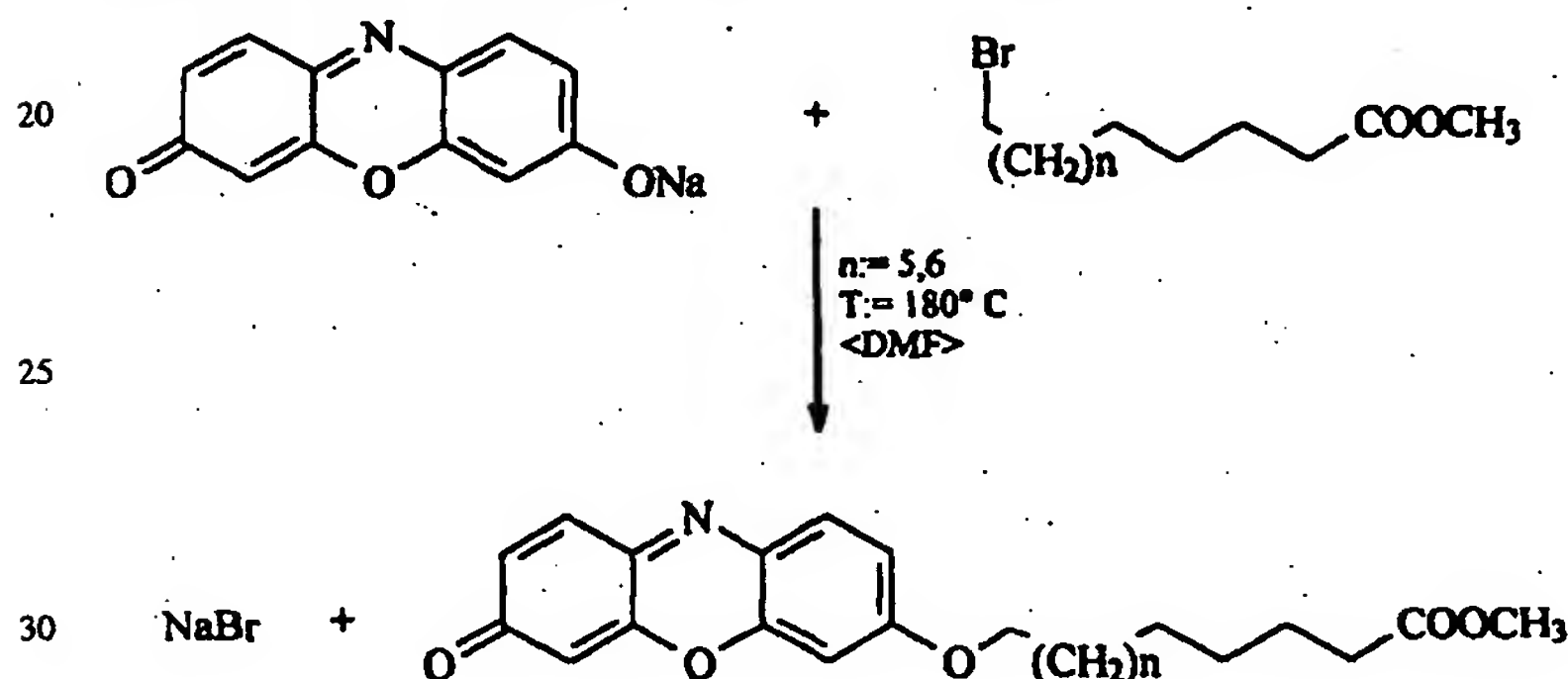
¹H-NMR: δ = 8,19 (d, 2H, NO₂-Phenyl-, J = 9,2 Hz), 6,94 (d, 2H, Phenyl-O-, J = 9,3 Hz), 4,05 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,5 Hz), 3,66 (s, 3H, -COOCH₃), 2,26 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,5 Hz), 1,79–1,85 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,59–1,66 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,43–1,49 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,26–1,35 (m, 18H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₉-CH₂-).

10 ¹³C-NMR: δ = 174,6 (-COO), 164,3 (C-4'), 141,3 (C-1'), 126,0 (C-2'), 114,4 (C-3'), 68,9 (-O-CH₂-), 51,7 (-COOCH₃), 34,0 (-CH₂-COO-), 29,7, 29,6, 29,5, 29,5, 29,4, 29,3, 29,3, 29,2, 29,1, 29,1, 26,1, 25,0 (C-3-C-14).

3. Herstellung von Resorufinylcarbonsäuren (RCA)

a) Darstellung von ω-Resorufinyldodekansäuremethylester und ω-Resorufinylundekansäuremethylester

15 Zur RCA-Synthese wurden die ω-Bromcarbonsäuren, entsprechend dem Vorgehen bei den pNCA-Verbindungen verestert, mit dem Natriumresorufinsalz in DMF umgesetzt und mittels einer PCL/CAL- B-Lipasemischung hydrolysiert.



Ansatz für ω-Resorufinylaurinsäuremethylester:

0,90 g (3,1 mmol) 12-Bromlaurinsäuremethylester

35 0,72 g (3,1 mmol) Resorufin

50 ml DMF

Ansatz für ω-Resorufinylundekansäuremethylester:

0,75 g (2,7 mmol) 11-Bromundekansäuremethylester

0,63 g (2,7 mmol) Resorufin

40 50 ml DMF

Durchführung

45 Zur Lösung des Bromfettsäureesters in DMF gibt man Resorufin, das sich nicht vollständig löst, zu. Die dunkelviolette Suspension wird unter Rückfluß vier Stunden lang erhitzt und die Reaktion mittels DC (Laufmittel Petrolether : Diethylether 1 : 1) verfolgt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird der braune Niederschlag in Petrolether : Essigsäureethylester 1 : 1 eine halbe Stunde lang gelöst und mittels einer DC60 (Merck)-Kieselgelchromatographiesäule in dem gleichen Laufmittelgemisch gereinigt. Die Säule sollte nicht zu groß gewählt werden, da die Verbindung in geringem Maße auf der Säule zerfällt.

50 ω-Resorufinylaurinsäuremethylester: Ausbeute: 17

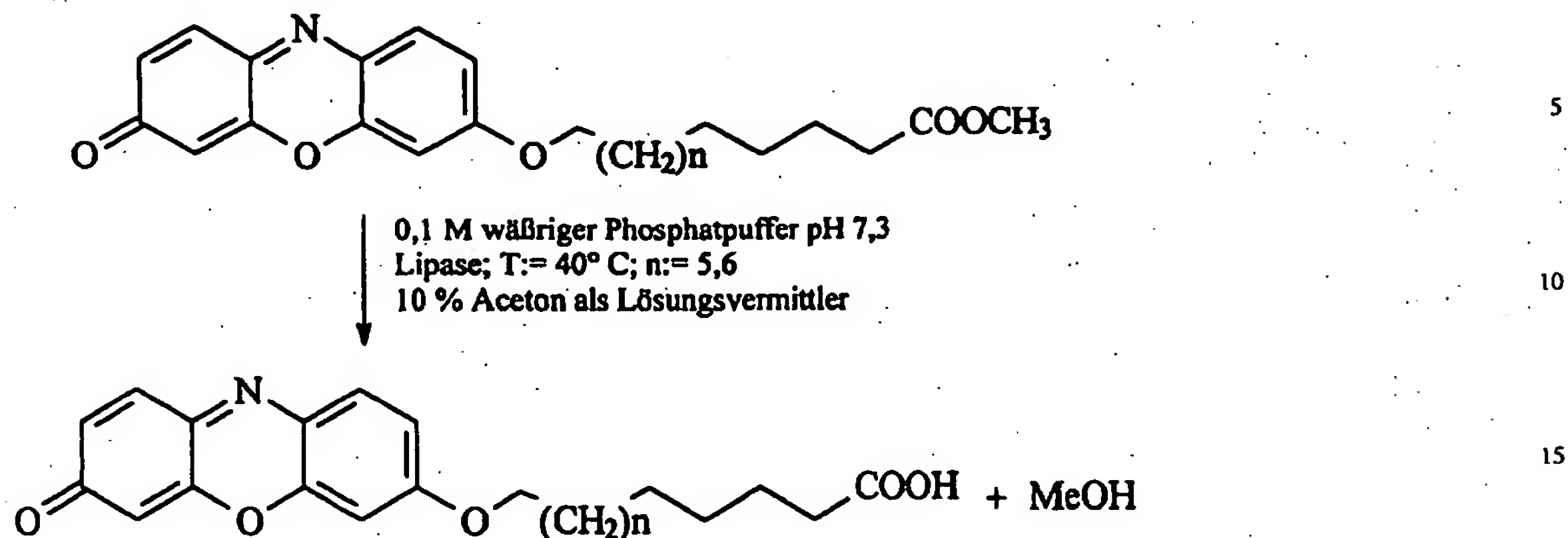
¹H-NMR: δ = 7,62 (d, 1H, -H-9', J = 8,89 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J = 9,79 Hz), 6,85 (dd, 1H, -H-8', J_{8,9} = 8,87 Hz, J_{8,6} = 2,41 Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', J_{2,1} = 9,74 Hz, J_{2,4} = 1,74 Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J = 2,40 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J = 1,74 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,50 Hz), 3,59 (s, 3H, -COO-CH₃), 2,23 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,50 Hz), 1,73–1,79 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,53–1,56 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,37–1,41 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,22–1,29 (m, 12H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-).

55 ¹³C-NMR: δ = 186,7 (-C-3'), 174,7 (-COO), 163,7, 150,3, 146,1, 145,7 (C-4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,1, 134,5, 131,9, 128,7, 114,5, 107,1, 100,8 (C-2', C-4', C-1', C-9', C-6', C-8', C-9'), 69,5 (-O-CH₂-), 51,9 (-COO-CH₃), 34,5 (-CH₂-COO-), 30,1, 29,8, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-11).

ω-Resorufinylundekansäuremethylester: Ausbeute: 15%;

60 ¹H-NMR: δ = 7,62 (d, 1H, -H-9', J = 8,91 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J = 9,70 Hz), 6,86 (dd, 1H, -H-8', J_{8,9} = 8,90 Hz, J_{8,6} = 2,53 Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', J_{2,1} = 9,72 Hz, J_{2,4} = 1,95 Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J = 2,54 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J = 1,94 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,49 Hz), 3,60 (s, 3H, -COO-CH₃), 2,23 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,50 Hz), 1,74–1,79 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,54–1,57 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,35–1,42 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,18–1,29 (m, 10H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₂-).

65 ¹³C-NMR: δ = 186,7 (-C-3'), 174,7 (-COO), 163,7, 150,3, 146,1, 145,7 (C-4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,0, 135,0, 132,0, 128,6, 114,5, 107,0, 100,8 (C-2', C-4', C-1', C-9', C-6', C-8', C-9'), 69,5 (-O-CH₂-), 51,8 (-COO-CH₃), 34,5 (-CH₂-COO-), 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-10).

b) Darstellung von ω -Resorufinyldodekansäure und ω -Resorufinylundekansäure

Vorversuche

20

Chemische Hydrolyse mittels NaOH führte zur Spaltung des Esters, jedoch konnte das gewünschte gelb-orange Produkt nur in Ausbeuten von 10% isoliert werden; die Ursache liegt darin, daß der Resorufinyl-Aromat in stark alkalischen Lösungen (pH>12) unter Farbverlust zerfällt. Auf DC-Plättchen waren fünf Produkte erkennbar. Im alkalischen Medium zeigt der Resorufinylfettsäureester eine grünliche Färbung. Die Spaltung mittels Lipasen verlief nach Optimierung der Aufarbeitung wesentlich erfolgreicher. Zur Wahl einer geeigneten Lipase wurden folgende Lipasen im Thermomixer bei 40°C über Nacht in einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 mit 10% Aceton als Lösungsmittel getestet: *Candida antarctica* Lipase A und B, *Aspergillus niger* Lipase und *Pseudomonas cepacia* Lipase (PCL). Die *Candida antarctica* Lipase B und die PCL spalten die Resorufinylcarbonsäureester, wobei letztendlich die PCL-Lipase zur präparativen Ester-spaltung verwendet wurde.

25

30

Ansatz für ω -Resorufinyldodekansäure:

40 mg (94 μ mol) ω -Resorufinyldodekansäuremethylester

2 ml Aceton

18 ml Natriumphosphatpuffer, pH 7,3

Spatelspitze PCL-Lipase

35

Ansatz für ω -Resorufinylundekansäure:

36 mg (30 μ mol) ω -Resorufinylundekansäuremethylester

2 ml Aceton

18 ml Natriumphosphatpuffer, pH 7,3

Spatelspitze PCL-Lipase

40

Durchführung

In einem 50 ml Rundkolben werden die Ester in Aceton gelöst, nach Zugabe von 9 ml Natriumphosphatpuffer, pH 7,3 wird eine Spatelspitze PCL zugegeben und bei 40°C über Nacht inkubiert. Der Reaktionsablauf wird mittels DC (Laufmittel Petrolether : Diethylether 1 : 1) verfolgt. Nach mehrfacher vorsichtiger Extraktion mittels Chloroform wird die Chloroformphase zwei Mal mit demineralisiertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat vier Stunden getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingedunstet.

45

ω -Resorufinylaurinsäure: Ausbeute: 73%

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 7,62 (d, 1H, -H-9', J = 8,9 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J = 9,8 Hz), 6,85 (dd, 1H, -H-8', $J_{8,9'} = 8,87$ Hz, $J_{8,6'} = 2,4$ Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', $J_{2,1'} = 9,7$ Hz, $J_{2,4'} = 1,7$ Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J = 2,4 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J = 1,7 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,5 Hz), 2,34 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,5 Hz), 1,73–1,79 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,55–1,59 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,37–1,41 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,22–1,29 (m, 12H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₆-CH₂-).

50

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 186,6 (-C-3'), 180,4 (-COO), 163,7, 150,3, 146,1, 145,7 (C-4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,1, 134,5, 131,9, 128,7, 114,5, 107,1, 100,8 (C-2', C-4', C-1', C-9', C-6', C-8', C-9'), 69,5 (-O-CH₂-), 34,2 (-CH₂-COO-), 30,1, 29,8, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-11).

55

ω -Resorufinylundekansäure: Ausbeute: 78%

$^1\text{H-NMR}$: δ : = 7,63 (d, 1H, -H-9', J = 8,9 Hz), 7,35 (d, 1H, -H-1', J = 9,7 Hz), 6,85 (dd, 1H, -H-8', $J_{8,9'} = 8,9$ Hz, $J_{8,6'} = 2,53$ Hz), 6,76 (dd, 1H, -H-2', $J_{2,1'} = 9,7$ Hz, $J_{2,4'} = 1,9$ Hz), 6,73 (d, 1H, -H-6', J = 2,5 Hz), 6,25 (d, 1H, -H-4', J = 1,9 Hz), 3,98 (t, 2H, Phenyl-O-CH₂-, J = 6,5 Hz), 2,35 (t, 2H, -CH₂-COO, J = 7,5 Hz), 1,74–1,79 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-), 1,54–1,59 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO), 1,35–1,42 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,18–1,29 (m, 10H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₅-CH₂-).

60

$^{13}\text{C-NMR}$: δ : = 186,7 (-C-3'), 180,7 (-COO), 163,7, 150,3, 146,1, 145,7 (C-4a', C-5a', C-9a', C-10a'), 135,0, 135,0, 132,0, 128,6, 114,5, 107,0, 100,8 (C-2', C-4', C-1', C-9', C-6', C-8', C-9'), 69,5 (-O-CH₂-), 34,1 (-CH₂-COO-), 29,9, 29,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 26,3, 25,3 (C-3-C-10).

65

c) Aktivitätstest von P450 BM-3 mit ω -Resorufinylaurinsäure und ω -Resorufinylundekansäure

Eine Spatelspitze der 11- oder 12-RCA wurden in 0,5 ml Aceton, Ethanol, THF, Dioxan und 5,5 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5, 0,1 M) gelöst. Zu den als Lösungsvermittler fungierenden organischen Lösungsmitteln wurde 5 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5, 0,1 M) gegeben. Nach Zugabe von 5 nmol P450 wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und das P450 BM-3 durch Zugabe von 200 μ l NADPH (50 μ M) reduziert. Nach einer Stunde wurden 200 μ l der jeweiligen Reaktionsansätze in eine Mikrotiterplatte überführt. In der zweiten Reihe sind zusätzlich entsprechende Blindproben ohne NADPH-Zugabe pipettiert.

Referenzbeispiel 6

Analytische Methoden

1. Proteintrennung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Gereinigte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese 1 : 1 mit SDS-Probenpuffer (Tris/HCl 500 mM, pH 6,8, Glycerin 10% (v/v), SDS 20% (w/v), Mercaptoethanol 2 (w/v), Bromphenolblau 0,05%) vermischt und 5 min zur Proteindenaturierung auf 95°C erhitzt. Zur Analyse der Proteinexpression in E. coli Zellen wurden nach fünfstündiger Induktionsphase ($OD_{578} = 1,5-2,0$) 1 ml der Kultur abpipettiert und bei 12 000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 100 μ l des Probenpuffers aufgeschlossen und 1 min bei 12 000 g zentrifugiert. Nach Abkühlen der Proteinproben auf Eis erfolgte die Proteinauftrennung im Elektrophoresepuffer (9,0 g Tris, 43,2 g Glycerin, 3,0 g SDS, ddH₂O ad 600 ml) bei 25 mA pro Gel.

Als Proteinstandards dienten ein Niedermolekulargewichts-Marker (Phosphorylase B 97,4 kDa, BSA 66,3 kDa, Ovalbumin 45,0 kDa, Carboanhydrase 31,0 kDa, Trypsininhibitor 21,5 kDa, Lysozym 14,4 kDa) und ein Hochmolekulargewichts-Kit (Myosin 200 kDa, β -Galaktosidase 116,25 kDa, Phosphorylase B 97,4 kDa, BSA 66,3 kDa, Ovalbumin 45 kDa) von Bio-Rad (Richmond, USA). Zur Proteintrennung wurde ein 7,5 prozentiges Trenngel (2,5 ml Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8), 100 μ l SDS (10% (m/v), 2,5 ml Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid 30 : 1 (Roth), 50 μ l APS, 5 μ l TEMED) und 4 prozentiges Sammelgel (1 ml Sammelgelpuffer (12,11 g Tris, 0,8 g SDS, ad H₂O 200 ml, pH 6,8 mit HCl eingestellt), 0,52 μ l Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid 30 : 1 (Roth), 40 μ l APS 10% (w/v), 4 μ l TEMED verwendet. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine drei Stunden lang unter langsamem Schütteln mit Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliant Blue R250, 10% (v/v) Essigsäure, 30% Methanol) blau gefärbt. Die Inkubation in Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 30 Methanol) erfolgte bis deutliche Proteinbanden sichtbar wurden. Zur Dokumentation wurde das Gel luftblasenfrei zwischen ein Cellulose-Filterpapier und eine Kopierfolie gelegt und zwei Stunden im Gelrockner (Bio-Rad, Model 583) bei 80°C unter Hausvakuum getrocknet.

2. Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Nachweis

Proteinkonzentrationen wurden mittels des Bicinchoninsäure-(BCA) Protein-Nachweissystems von Pierce (St. Augustin, Deutschland) spektrometrisch bei 562 nm nach Herstellerangaben entsprechend dem Standardprotokoll bestimmt. Kalibriergeraden wurden mit BSA-Verdünnungen aufgenommen.

3. Spektroskopische Nachweismethoden

Alle spektroskopischen UV-Vis Nachweise wurden unter aeroben Bedingungen in einem Pharmacia Spectrophotometer, Modell BioChrom4060 (APB, Uppsala, Schweden), mit BioChrom4060 Windows 3.11 Software v2.0 durchgeführt.

a) Bestimmung der P450 Konzentration

P450 BM-3 Konzentrationen wurden mittels der CO-Differenzspektroskopiemethode (Omura et al. 1964) und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 125 nm/min in 0,1 nm Intervallen bestimmt. Dazu wurde zu 5 ml phosphatgepuffertem (20 mM, pH 7,3 bis 7,5) P450 BM-3 Rohextrakt eine Spatelspitze Natriumdithionit und 10 μ l einer 0,1 prozentigen (w/v) wäßrigen Methylviologen-Lösung gegeben. Die abhängig von der P450 BM-3 Konzentration tiefblaue bis blaugrüne Probe wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine der beiden Fraktionen wurde eine Minute lang mit CO begast, wobei Schaumbildung zu vermeiden ist, die andere dient als Referenz für die differenzspektroskopische Messung.

b) Messung der Reduktase-Aktivität

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 durchgeführt, wobei die Absorptionzunahme bei 550 nm mit $g = 8,9 \text{ mM}^{-1}$ (Fulco et al. 1992) gemessen wurde. 1 ml Probe enthielten 50 nmol Cytochrom c (aus Pfexdeherz), 100 nmol NADPH und eine aus Tabelle 6 ersichtlichen Menge P450 BM-3. Als Referenz diente dieselbe Probe vor NADPH-Zugabe. Die Lösungen wurden frisch bereitet und bis zur Benutzung am selben Tag auf Eis gelagert. Zur Messung der Reduktaseaktivität von P450 BM-3His₆ wurde zur Cytochrome-c-Lösung nach fünfminütiger Inkubation die NADPH-Lösung gegeben.

4. Protokolle zur Charakterisierung von P450 BM-3 und/oder P450 BM-3 F87A

Zur Messung der kinetischen Konstanten sowie der pH- und Temperaturstabilität wurde gereinigtes P450 BM-3 F87A

verwendet. Für alle anderen Bestimmungen wurde zentrifugierter und filtrierter klarer Rohextrakt verwendet. Für alle Experimente wurden pro Ansatz 0,05–0,2 nmol P450 BM-3 oder P450 BM-3 F87A in einem Gesamtvolumen von 1 ml und 8 µl 5–15 mM pNCA-Lösung verwendet. Mit Ausnahme der Lösungsmittelversuche wurden Charakterisierungsexperimente in 1 ml Einwelt-Plastikküvetten durchgeführt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt.

a) Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die kinetischen Konstanten wurden nach Zugabe von 792 µl Tris/HCl (pH 8,2, 0,2 M) und 100 µl P450 BM-3 zu 8 µl DMSO-Substratlösung unterschiedlicher Substratkonzentration ermittelt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 mM NADPH-Lösung gestartet.

b) Lösungsmittelstabilität von P450 BM-3 F87A

Die Messung der Lösungsmittelstabilitäten erfolgte in Glasküvetten (Hellma, Modell 6040) bestimmt, wobei die Substratlösung statt in DMSO in Aceton, Dioxan, THF und Ethanol gelöst wurde. Die Bestimmungen wurden entsprechend der bei den kinetischen Messungen beschriebenen Vorschrift durchgeführt; jedoch wurde in Unterschied dazu der Anteil des Puffers entsprechend der verwendeten Lösungsmittelmenge variiert.

c) pH-Stabilität und Temperaturstabilität von P450 BM-3 F87A

Die Messung der pH-Stabilität wurden bei 30°C im Stratagene Robocycler (Modell gradient40) in dünnwandigen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Stratagene) durchgeführt. Zu 0,1–0,2 nmol P450 BM-3 wurden 392 µl phosphatgepufferter Lösung (50 mM, pH 4–10) gegeben. Nach dem Inkubationszeitraum wurde die P450 BM-3 Lösung in eine Küvette überführt und 500 µl Tris/HCl (0,3 M, pH 8,2) und 8 µl 12-pNCA (6 mM) hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Reaktion mittels 100 µl NADPH-Lösung (1 mM) gestartet. Die Temperaturstabilität wurde bei einem pH-Wert von 7,5 unter den gleichen Bedingungen wie die pH-Stabilität untersucht.

d) Einfluß von Puffersalzkonzentrationen, Detergenzien, Proteaseinhibitoren, Thio-Verbindungen, Co(III)sepulchrät auf die P450 BM-3 F87 Aktivität

Die Auswirkungen dieser Verbindungen auf die P450 BM-3 F87A Aktivität sind in Analogie zu den kinetischen Untersuchungen durchgeführt worden, wobei ein variiertes Teil des Puffers durch die im selben Puffersystem gelöste Untersuchungssubstanz ersetzt wurde.

e) Automatisierter Aktivitätsnachweis

Für den automatisierten Aktivitätsnachweis von P450 BM-3 F87A wurden Mikrotiterplatten mit 96 Reaktionskammern (Greiner Frickenhausen, Deutschland) gewählt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 250 µl in einer Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) mit 18 nmol 10- und 11-pNCA, 12 nmol 12-pNCA oder 10 nmol 15-pNCA, die in 2,2 µl DMSO gelöst waren. Für die Pipettierarbeiten wurde eine Biomek2000 Pipettierroboter (Beckman Instruments, Fullerton, USA) verwendet. Nach fünfminütiger Inkubationszeit mit 0,02 nmol P450 BM-3 F87A wurde die Reaktion gestartet durch Einspritzen von 25 µl einer wäßrigen NADPH Lösung (1 mM) in jede Reaktionskammer. In einem FluoStar-Mikrotiterplattenleser (BMG LabTechnology, Offenburg, Deutschland) wurde der Reaktionsablauf bei 405 nm absortiv verfolgt.

f) Wasserstoffperoxid-Untersuchungen

Für Aktivitätsuntersuchungen wurde verfahren wie für die kinetischen Messungen beschrieben, nur daß statt NADPH variierte wäßrige Wasserstoffperoxidmengen zugegeben wurden. Bei den Stabilitätsuntersuchungen wurden 0,05–0,1 nmol P450 BM-3 F87A in Abwesenheit von pNCA-Substrat mit variierten Wasserstoffperoxidmengen fünf Minuten inkubiert. Nach Zugabe von Katalase (600 U) und einer weiteren fünfminütigen Inkubationszeit wurden zur Reaktionslösung 60 nmol 12-pNCA-Substrat pipettiert. Die Reaktion wurde fünf Minuten später durch Zugabe von 100 µl NADPH (1 mM) gestartet.

g) Zn-Mediator-Untersuchungen

Die Reaktionen wurden in einer Schüttelapparatur für Eppendorf-Reaktionsgefäß-Schüttler (IKA-Labortechnik Vibrax mit Janke und Kunkel Aufsatz Typ VX2E) durchgeführt. Für Aktivitätsuntersuchungen wurde verfahren wie für die kinetischen Messungen beschrieben, nur wurden anstelle von NADPH variierte Mengen an Zink/Cobalt(III)sepulchrät benutzt. Nach variierten Zeitintervallen wurden 100 µl Probe der Reaktionssuspension entnommen und in ein weiteres 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, in dem zum Reaktionsstop 10 µl KOH (6 M) vorgelegt waren. Nach einminütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der Überstand abgenommen und die Absorption bei 410 nm gemessen.

Klonierung, Expression und Reinigung von P450 BM-3 und Mutamen im Gramm-Maßstab

5 1. Klonierung des P450 BM-3 Gens und der Mutante P450 BM-3 F87A und deren Expression in 30-l-Fermentationen

Das P450 BM-3 Gen wurde mittels PCR aus der genomischen DNA von *Bacillus megaterium* isoliert, mit Tags versehen und wie in Fig. 1 für die pT-Plasmide gezeigt, in die Expressionsvektoren pCYTEXPl und pASK-IBAICA kloniert. Zur Überprüfung der korrekten Insertion des P450 BM-3 Gens, der mit unterschiedlichen Tags versehen P450 BM-3 Varianten und zur Überprüfung der P450 BM-3 F87A Punktmutante wurden die Sequenzierprimer R0_5 bis L7 verwendet. Für die PCR-Reaktionen nach dem Standard-Protokoll wurden für das Wildtyp-Enzym die Primer B1 und B2, für die P450 BM-3His₆ die Primer H₁ und H₂, für P450 BM-3Glu₆ die Primer G1 und G2, für P450 BM-3Arg₆ die Primer A1 und A2 und für P450 BM-3Strep die Primer S1 und S2 verwendet. Die Sequenzanalyse ergab keinerlei Mutationen für einen aus jeweils drei sequenzierten pT-USCOBM3- und pT-USC1BM3-Plasmiden. Für pT-USC2BM3 und pT-USC3BM3 wurde nur mit Primer R7 die korrekte Insertion des Tags überprüft. Der sequenzierte pA-USC4BM3-Klon zeigte zwei Mutationen im Reduktaseanteil des P450 BM-3 Proteins. Die Expressionsrate des mit einem His₆-Tag versehen P450 BM-3 in DH5 α war mit Werten von 300 nmol pro Liter Fermenterbrühe um ca. 20% höher als beim Wildtyp. Aufgrund dieser höheren Expressionsrate wurde pT-USC1BM3 zur Erhöhung der Sensitivität des pNCA-Tests an Position 87 durch Austausch eines Phenylalanins gegen Alanin mit den Stratagene QuikChange-Kit punktmutiert. Durch die PCR-Reaktion mit den Primern F87A1 und F87A2 enthält pT-USC1BM3F87A an der Mutationsposition ohne weitere Veränderung der Proteinsequenz eine zusätzliche EaeI-Restriktionsschnittstelle, die zur Selektion des zur Sequenzierung ausgewählten Klons verwendet wurde. Diese zusätzliche Restriktionsschnittstelle führt nach Restriktionsspaltung mit EaeI zum Auftreten einer neuen Bande bei ca. 800 bp in Spur 2 und einer gegenüber dem Wildtyp-Verdau in Spur 1 deutlich kleineren Bande bei 1,7 kbp. Nach Plasmidisolation wurden acht Klone mit EaeI verdaut (2 μ l EaeI-Puffer (10 \times), 1 μ l EaeI 3,2 μ l pT-USC1BM3, ad 20 μ l ddH₂O, 1 h bei 37°C). Ein Klon wurde sequenziert. Das pT-USC1BM3F87A Plasmid besitzt in der Linker-Region an Position 470 eine zusätzliche Mutation R470C. Auf eine Rückmutation wurde verzichtet aufgrund der Lokalisation der Mutation R470C am Ende der Linker-Region, die den P450-Anteil des P450 BM-3 mit dem Reduktaseanteil verbindet und keinerlei Einfluß auf die P450 BM-3 Aktivität zeigt.

30 2. Reinigung von P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A

Ziel war es, eine kostengünstige, rasche und im präparativen Maßstab durchführbare Methode zur Reinigung von P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A zu entwickeln. Dazu wurde ein Arg₆-, His₆-, Glu₆- und Strep-Tag an das C-terminale Ende von P450 BM-3 angefügt. Auf der Basis des His₆- und Strep-Tag sollten Affinitätsreinigungen und auf Basis des Arg₆- und Glu₆-Tags chromatographische Reinigungen mit Ionenaustauschern entwickelt werden. Ein Einfügen eines Tags an das N-terminale Ende des P450 BM-3 Gens wurde wegen der Lokalisation des N-Terminus im Bereich des flexiblen Substrateingangskanals nicht in Betracht gezogen. Eine Modifikation in diesem Bereich würde mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Änderung der P450 BM-3 Aktivität und Selektivität führen.

40 2.1 Proteinreinigungen mit Affinitätschromatographie

a) P450 BM-3 mit His₆-Tag

Bei der P450 BM-3His₆-Reinigung über Metallchelatchromatographie binden mehr als 95% der aufgetragenen 4 mg P450 BM-3 nicht an die 20 ml XK16/20-Affinitätssäule bei einem linearen 0–0,5 molaren Imidazolgradienten (10 CV). Die chromatographische Reinigung mit Zn²⁺-Ionen wurde nach dem Pharmacia-Standardprotokoll durchgeführt. Das wenige aufgereinigte P450 BM-3 zeigte im NADPH-Assay keine Aktivität mehr. Die Ursache dieser Inhibierung konnte auf den Einfluß von Imidazol zurückgeführt werden. Imidazol bewirkt ein Ablösen des fünften Cysteinat-Liganden am katalytischen Häm-Zentrum. Diese Abdissoziation des fünften Liganden vom Häm-System führt zur sofortigen P450-Inaktivierung und zeigt sich im CO-Differenzspektrum durch eine charakteristische Verschiebung des Absorptionsmaximums von 448 nm nach 420 nm.

b) P450 BM-3 mit Strep-Tag

55 Zur Aufreinigung wurden 8,2 mg P450 BM-3Strep verwendet. Vergleichbar den Ergebnissen der His₆-Tag Reinigungen zeigte P450 BM-3Strep keine Bindung an die Streptavidin-Affinitätsmatrix bei der Reinigung entsprechend dem READY TO USE KIT (IBA, Göttingen).

c) P450 BM-3 mit Glu₆-Tag

60 Ein Vergleich der linearen 0–1 M NaCl-Gradienten (12 CV, Tris/HCl Puffer (0,1 M, pH 8,0)) zeigte für P450 BM-3Glu₆ bei Verwendung von Super 650M- und DEAE 650M-Anionenaustauschern keine Unterschiede im Elutionsverhalten zum Wildtyp-Enzym.

65 d) Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse der Reinigung von P450 BM-3 mit His₆-, Glu₆- und Strep-Tag lassen darauf schließen, daß das C-terminale Ende von P450 BM-3 nicht frei zugänglich an der Proteinoberfläche liegt und somit nicht für Reinigungszwecke

verwendbar ist, Ferner verursachte im Falle des His₆-Tags die Elution mittels Imidazol eine rasche Proteininaktivierung durch Verdrängung des fünften Liganden am Porphyrin-System.

2.2 Anionenaustauschchromatographie

Um die Kosten zu minimieren, sollte eine effektive, kostengünstige und zeitsparende Reinigungsmethode für P450 BM-3 entwickelt werden, die eine einfache Maßstabsvergrößerung erlaubt. Als Methoden zur P450 BM-3 Reinigung standen nach den Ergebnissen der Reinigung von P450 BM-3 mit Tags somit noch nur HIC-Materialien und Ionenaustauscher zur Verfügung. Die Entscheidung fiel zugunsten der Anionenaustauscher, die in der Regel billiger sind und ein einfacheres Handling bieten.

a) Linearer und Stufengradient

Um eine Anionenaustauschchromatographiemethode zu entwickeln wurden vier unterschiedlich starke Anionenaustauschermaterialien DEAE 6505 (35 µm), DEAE 650M (65 µm), SuperQ 650M (65 µm) und QAE 550M (65 µm) auf ihre Eignung hin untersucht. In ersten Experimenten wurde mit jedem Säulenmaterial ein 10-Säulen-Volumen (CV) langer linearer 0–1 M NaCl-Gradient zur Reinigung von 6–10 mg P450 BM-3 Rohextrakt in einem Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,8) aufgenommen. In allen Fällen betrug die Ausbeute 80–84%. Die höchsten Proteinanteile im P450 BM-3 Elutionspeak zeigte das DEAE-Material, dicht gefolgt vom SuperQ- und QAE-Material.

Für die weitere Verbesserung der Auflösung mittels gestufter Salzgradienten war die Fähigkeit des ÄKTAexplorer-Systems hilfreich, gleichzeitig Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm und 417 nm aufzuzeichnen. Ein optimierter Zwei-Stufen-Salzgradient für die DEAE 650M Chromatographiesäule besitzt eine erste Stufe von 150 mM NaCl und eine zweite mit 250 mM NaCl. Die P450 BM-3 Elution beginnt, wie aus den Leitfähigkeitswerten des linearen NaCl-Salzgradienten ablesbar, bei einer Erhöhung der NaCl-Konzentration von 150 mM auf 170 mM. Die minimale obere Salzstufe wurde zu 250 mM NaCl ermittelt; NaCl-Konzentrationen < 230 mM verursachen eine Verbreiterung des P450 BM-3 Elutionspeaks, und NaCl-Konzentrationen > 300 mM führen zu einem deutlich schlechteren Reinigungseffekt. Die Salzstufen wurden für die Chromatographiematerialien SuperQ 650M und QAE 550M in vergleichbarer Weise optimiert.

Ein Vergleich des linearen DEAE 650M mit dem gestuften NaCl-Gradienten führt zu einer Erhöhung des P450 BM-3 Proteinanteils im Elutionspeak von 39% beim linearen, auf 84% beim gestuften Gradienten. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem SuperQ 650M Chromatographiematerial erreicht; das QAE 550M Chromatographiematerial zeigte deutlich schlechtere Reinigungsergebnisse. Bei den gestuften Reinigungsmethoden lagen die Ausbeuten in allen Fällen bei > 78%; die höchsten Ausbeuten von 93% an P450 BM-3 im Elutionspeak wurden mit DEAE 650S erzielt.

Beispiel 2

Entwicklung eines spektroskopischen Aktivitätsnachweises für P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A

Ziel war es einen spektrometrischen oder fluorimetrischen Aktivitätsnachweis für P450 BM-3 zu entwickeln. Ein solcher Aktivitätsnachweis kann im Gegensatz zu Standardmethoden wie HPLC oder GC einfach automatisiert und somit zum Auffinden von weiteren P450 BM-3 Enzymvarianten verwendet werden.

Um einen neuen Aktivitätsnachweis für P450 BM-3 zu entwickeln, wurden verschiedene Verbindungen, die am terminalen C-Atom der Carbonsäuren das Chromophor tragen, synthetisiert und auf ihre Eignung untersucht.

Arbeiten von Oliver et al. Biochemistry (1997), 36(7): 1567 zeigten für Laurinsäure und Myristinsäure als Substrat eine Verschiebung des Hydroxylierungsprofils von P450 BM-3 von subterminalen Positionen zur terminalen Position, falls Phenylalanin an Position 87 durch Alanin ersetzt wurde. Zur Erhöhung der Sensitivität der pNCA-Nachweismethode wurde diese Punktmutation, wie in Material und Methoden beschrieben, eingefügt und mittels Sequenzanalyse bestätigt.

1. Nachweisprinzip

Fig. 2 zeigt das Prinzip zu einem spektrometrischen Aktivitätsnachweis für terminal hydroxylierende Fettsäurehydroxylasen. Nach terminaler Hydroxylierung entsteht ein instabiles Halbacetal, das in die w-Oxycarbonsäure und das spektrometrisch detektierbare Chromophor dissoziiert.

2. Nachweis der P450 BM-3 F87A Aktivität mit PCA

a) Synthese der Phenoxycarbonsäuren (PCA)

Die PCA-Verbindungen wurden in einer einstufigen Synthese, wie in Referenzbeispiel 5 beschrieben, ausgehend von ω-Bromcarbonsäuren synthetisiert. Die Synthesen gelangen in Gesamtausbeuten zwischen 76 und 78%. Charakterisiert wurden die PCAs mittels ¹H-NMR, ¹³C-NMR und Schmelzpunktbestimmung.

b) Wahl der Reaktionsbedingungen

Um die Phenolbildung spektroskopisch nachweisen zu können, bietet es sich an, die Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 280 nm zu messen (Luchter-Wasylewska 1996). Der geringe Extinktionskoeffizient am Absorptionsmaximum bei 274 nm von $\epsilon = 1090 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, das unterschiedliche Absorptionsverhalten von NADPH und NADP⁺ in diesem Wellenbereich und die Bildung von Wasserstoffperoxid in ungekoppelten Reaktionen verhinderten jedoch eine

kontinuierliche spektroskopische Messung der Phenolbildung. Aus diesen Gründen wurde der Merck-Phenol-Nachweis Kit, zur Quantifizierung der Produktbildung verwendet. Mit NADPH als Cofaktor ergaben sich bei Verwendung der P450 BM-3 Mutante F87A für 12-PCA Umsatzgeschwindigkeiten von 640 eq/min und für 11-PCA von 410 eq/min.

5 3. Nachweis der P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A Aktivität mit pNCA-Substraten

a) Synthese der p-Nitrophenoxycarbonsäuren (pNCA)

Die pNCA-Verbindungen wurden in einer neuen, dreistufigen Synthese, wie in Referenzbeispiel 5 beschrieben, ausgehend von ω -Bromcarbonsäuren durch Veresterung, sich anschließender s_N2 -Reaktion mit dem Natrium-p-Nitrophenolat und lipasekatalysierter Hydrolyse der Ester, synthetisiert. Die dreistufigen pNCA-Synthesen gelangen in Gesamtausbeuten zwischen 61 und 69%. Charakterisiert wurden die pNCAs mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und Schmelzpunktbestimmung.

15 b) Wahl der Reaktionsbedingungen

In Fig. 2 ist das Reaktionsprinzip der Umsetzung von pNCA-Substraten durch P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A beschrieben. Für die Aktivitätsmessungen mußten pH-Wert und Wellenlänge des spektroskopischen Nachweissystems optimiert werden. Nur deprotoniertes p-Nitrophenolat (pK_s -Wert 7,1) trägt zur gelben Farbe bei; für die Nachweisempfindlichkeit wäre somit ein pH-Wert $>9,1$ ($>99\%$ deprotoniert) empfehlenswert. Die pNCA-Verbindungen sind in stark alkalischen Lösungen stabil, im Gegensatz zum P450 BM-3 Protein, das bei pH 10 und 30°C innerhalb von 5 min 80% seiner Aktivität verliert. Als Kompromiß zwischen Proteinstabilität und Sensitivität der Nachweismethode wurde ein pH-Wert von 8,1 bis 8,2 gewählt. Berechnungen auf der Basis der Henderson-Hasselbach-Gleichung zeigen, daß in diesem pH-Bereich 90–92% des umgesetzten p-Nitrophenols deprotoniert sind und zur gelben Farbe beitragen. Das Absorptionsmaximum von p-Nitrophenolat liegt bei 400 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren jedoch auch das Häm-Zentrum und der Cofaktor NADPH. P450 BM-3 besitzt ein starkes Absorptionsverhalten zwischen 350 und 450 nm, das in Abhängigkeit von Substratbindung und Oxidationsstufe des Eisens im katalytischen Zentrum stark schwankt. Das Absorptionsspektrum von NADPH begrenzt den Wellenlängenbereich auf $>390\text{ nm}$. Die Wellenlänge 410 nm wurde aufgrund der Reproduzierbarkeit letztendlich zur Aktivitätsmessung ausgewählt. Falls die Sensitivität des Nachweissystems nicht ausreichend ist, sollte bei Wellenlängen im Bereich von 400 nm gearbeitet werden. Unter den gewählten Nachweisbedingungen (pH 8,2, 410 nm) wurde der Extinktionskoeffizient bestimmt zu $\epsilon = 13\,200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

pNCAs besitzen nur eine geringe Wasserlöslichkeit, so daß ein Lösungsvermittler benötigt wird. Dazu kann DMSO ohne Beeinflussung der P450 BM-3 F87A Aktivität bis zu Konzentrationen von 1% (v/v) zugegeben werden. 0,8% (v/v) DMSO wurden deshalb als Lösungsvermittler im Aktivitätsnachweissystem verwendet.

35 Der Zeitbedarf des pNCA-Nachweissystems hängt stark von der verwendeten Enzymmenge ab. Falls nmol-Mengen an P450 BM-3 F87A im pNCA-Aktivitätsnachweis eingesetzt wurde, war 1 min zum Aktivitätsnachweis ausreichend.

c) Automatisierung des pNCA-Nachweises

40 Für den Einsatz in einer HTS-Umgebung wurde der pNCA-Aktivitätsnachweis unter Benutzung einer Biomek2000 Arbeitsstation und eines BMG FluoStar Mikrotiterplattenleser automatisiert. Unter Verwendung von P450 BM-3 und der Mutante F87A wurde in jeweils 16 Messungen mit den pNCA-Substraten 10-, 11-, 12- und 15-pNCA die Reproduzierbarkeit des Assaysystems untersucht. Bei den Gesamtabsorptionen gab es aufgrund von Pipettierungenauigkeiten Unterschiede um den Faktor zwei bis vier, die Reaktivitätsunterschiede schwankten jedoch nur zwischen 2 und 6%. Die beste Reproduzierbarkeit wurde für die P450 BM-3 F87A Mutante erzielt mit Abweichungen $\sim 2\%$ und die schlechteste für den Wildtyp und 15-pNCA mit Abweichungen von bis zu 6% vom Mittelwert aller Messungen. Ursächlich für die Genauigkeitsunterschiede sind die unterschiedliche Löslichkeit der pNCA-Substrate und verschiedene Umsätze in Abhängigkeit von der Kettenlänge.

Die F87A Mutante setzt 12-pNCA vollständig um, während das Wildtyp-Enzym nach 33% stoppt. Die Ursache liegt vermutlich in subterminal hydroxylierten 12-pNCA-Verbindungen, die nicht mehr oder nur noch langsam weiter umgesetzt werden. Für P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A sind das pNCA-Kettenlängenprofil und der Umsatz aus w-Hydroxylierung der pNCAs, berechnet aus dem Quotienten von beobachteten zu gemessener Gelbfärbung der Lösung in den folgenden Tabellen 4 und 5 zusammengefaßt. Zusätzlich wurden für P450 F87A die kinetischen Daten aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelt.

Tabelle 4

Kettenlänge der pNCA-Verbindung	P450 BM-3 F87A k_{cat} [eq ^a /min]	P450 BM-3 F87A w-Hydroxylierungsprodukte [%]	P450 BM-3 Wildtyp k_{cat} [eq ^a /min]	P450 BM-3 Wildtyp w-Hydroxylierungsprodukte [%]
6	nicht umgesetzt	nicht umgesetzt	nicht umgesetzt	nicht umgesetzt
8	1	<1	2	<1
10	426	94	322	98
11	204	64	267	63
12	574	100	114	33
15	680	61	246	35

^a anstatt des Ausdrucks nmol (Substrat)/nmol (P450) wird Equivalente (eq) verwendet

Tabelle 5

Kettenlänge der pNCA-Verbindung	P450 BM-3 F87A k_{cat} [eq ^a /min]	K_m [mM]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ ·min ⁻¹]
10	426 " 32	42 " 8	$1.0 \cdot 10^7$
11	204 " 18	69 "	$3.4 \cdot 10^5$
12	574 " 47	6,2 "	$1.1 \cdot 10^4$
15	680	-	-

^a anstatt des Ausdrucks nmol (Substrat)/nmol (P450) wird Equivalente (eq) verwendet

Beispiel 3

Neues Cofaktor-System für P450 BM-3 und P450 BM-3 F87A

Ein Haupthindernis der industriellen Nutzung von P450-Systemen sind die Kosten, die der Cofaktor NADPH verursacht. Zur Lösung des Kostenproblems wurde ein alternatives Cofaktor-Konzept entwickelt, bei dem NADPH durch Zink und den Mediator Cobalt(III)sepulchrat ersetzt wurde; Zink dient als Elektronenquelle und Cobalt(III)sepulchrat als Elektronentransportsystem vom Zink zum P450 BM-3.

1. Nachweis der Reduktion von Cobalt(III)sepulchrat durch Zink

Cobalt(III)sepulchrat besitzt unter Standardbedingungen ein Normalpotential von -0,54 V gegen eine Kalomel-Elektrode (Creaser et al., J. Am. Chem. Soc. (1977) 99: 3181). Es läßt sich, wie in Abb. 48 gezeigt, mittels Zn-Staub in einem Tris/HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,2) innerhalb von Sekunden reduzieren. In Gegenwart von Luftsauerstoff in wäßrigen Lö-

sungen wird es innerhalb weniger Minuten wieder zu Cobalt(III)sepulchrat oxidiert.

2. Nachweis der P450 BM-3 F87A Aktivität mit alternativem Cofaktor-System

2.1 pNCA-Assay

Fig. 4 zeigt die Umsetzung von 12-pNCA mittels des Zn/Cobalt(III)sepulchrat/P450 BM-3 F87A Systems. Bei einem Absorptionsmaximum von 0,8 nach 8 min zeigt das Zn/Cobalt(III)sepulchrat/P450 BM-3 F87A System eine gelbe Farbe, die einem 70%igen Umsatz entspricht. Innerhalb von 20 min verschwindet die durch p-Nitrophenolat verursachte gelbe Farbe völlig; der Restabsorptionswert von 0,15 stammt vom Mediator. Kontrollexperimente zeigten, daß Zn-Pulver die Nitrogruppe von p-Nitrophenolat im Tris/HCl-Puffer (pH 8,2, 50 mM, 0,25 M KCl) reduziert. Weitere Kontrollexperimente zeigten, daß Wasserstoffperoxid keinen oxidativen Einfluß auf p-Nitrophenolat und pNCAs hat.

In Fig. 5 sind die beschriebenen Elektronentransferwege von Zn über den Mediator zum P450 BM-3 und der Substratumsatzung unter Berücksichtigung des verkürzten Wasserstoffperoxid-Reaktionswegs ("shunt-pathway") dargestellt.

2.2 PCA-Assay

Aufgrund der Reduktion von p-Nitrophenol durch Zink in einem Tris/HCl-Puffer wurde 12-pNCA durch 12-PCA ersetzt. Der Phenolnachweis erfolgte mittels des Merck-Phenolnachweis-Kits bei 495 nm. Ein direkter photometrischer Phenolnachweis bei 274 nm ist aufgrund des Absorptionsverhaltens des oxidierten und reduzierten Cobalt(III)sepulchrat nicht möglich. Fig. 6 verdeutlicht für 12-PCA als Substrat eine im Vergleich zu 12-pNCA langsame Entfärbung (Fig. 4). Als Ursache für die Absorptionsabnahme konnte Wasserstoffperoxid identifiziert werden, das durch reduziertes Cobalt(II)sepulchrat in Nebenreaktionen durch Reduktion von Luftsauerstoff in wäßrigen Lösungen gebildet wird. Ferner tritt Wasserstoffperoxid-Bildung bei P450-Systemen infolge von ungekoppelten Reaktionen als Nebenreaktionsprodukt immer auf. Aus letzterem Grund wurde eine weitere Optimierung der PCA-Reaktionsbedingungen nicht weiter verfolgt.

In Gegenwart von 600 U Katalase erfolgt, wie in Fig. 6 gezeigt, die Absorptionsabnahme bei 495 nm deutlich langsamer.

3.1 Pufferzusammensetzung

Um die Entfärbung der Lösung durch die Reduktion von p-Nitrophenolat mittels Zink zu vermeiden, wurde zunächst erfolglos die KCl-Konzentration und der pH-Wert im Rahmen der P450 BM-3 F87A Stabilität variiert (6,5–8,5). Erfolgreich, wie in Fig. 7 gezeigt, kann die Reduktion von p-Nitrophenol durch Zink mittels Zusätzen an Kaliumphosphat-Puffer verhindert werden. Ab einem Kaliumphosphatanteil $\geq 10\%$ wird p-Nitrophenol nur noch in geringem Ausmaß ($\leq 10\%$) durch Zn reduziert und bei einer 1 : 1 Mischung ist selbst nach 14 h keine weitere Reduktion mehr feststellbar (nicht abgebildet). Wie in Fig. 7 gezeigt, verringert sich der Anteil an reduziertem Co(II)sepulchrat im Mischungsbereich bis zu 20 Kaliumphosphat zunächst deutlich um ca. $\sim 25\%$, um dann zwischen 20 und 70% (v/v) Kaliumphosphat-Anteil konstant zwischen 60 bis 70% zu verharren. Die im Vergleich zum Tris/HCl-Puffersystem geringere Verfügbarkeit an reduziertem Cobalt(II)sepulchrat führt zu einem Aktivitätsverlust von ca. 15%.

Aus obigen Ergebnissen wurde für die weiteren Optimierungen eine 1 : 1 Mischung beider Pufferlösungen verwendet.

1.2 Einfluß der Mediatorkonzentration auf den Umsatz und die P450 BM-3 F87A Aktivität

Fig. 8A zeigt den Einfluß des Cobalt(III)sepulchrat Mediators auf die P450 BM-3 Aktivität im NADPH-Assay bei variierten Mediatorkonzentrationen. Bei Cobalt(III)sepulchrat-Konzentrationen ≥ 5 mM bildete sich während des Reaktionsablaufs ein kolloidaler Niederschlag, der vor Absorptionsmessung mittels Zentrifugation abgetrennt wurde. Für Umsetzungen mit dem Zink/Cobalt(III)sepulchrat-System ist eine optimale Cobalt(III)sepulchrat-Konzentration im Bereich von 0,5–0,75 mM pro 0,072 nmol P450 BM-3 F87A vorhanden. Wie in Fig. 8B gezeigt, inhibiert Cobalt(III)sepulchrat bis zu Konzentrationen $\leq 0,5$ mM P450 BM-3 F87A selbst in Abwesenheit von Substrat nur geringfügig. Der Inhibierungsgrad bleibt bei variierten Inkubationszeiten konstant und hängt nur vom Konzentrationsverhältnis Cobalt(III)sepulchrat zu P450 BM-3 F87A ab.

3.3 Zn-Konzentration

Die Abhängigkeit des Umsatzes von 0,072 nmol P450 BM-3 F87A von der eingesetzten Zinkpulvermenge ist in Fig. 9 gezeigt. Ein optimaler Umsatz wurde im Bereich von 20 bis 40 mg Zink pro Milliliter Reaktionslösung erzielt. Für die Umsatzrückgänge bei 50 und 100 mg war vermutlich eine abnehmende Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung durch zunehmende mediatorkatalysierte Wasserstoffperoxidbildung verantwortlich.

Ein Ersatz von Zinkpulver durch Zinkgranalien führte selbst bei Verwendung von 100fach erhöhten Mengen nur zu sehr geringen Umsatzgeschwindigkeiten (Faktor >20 geringer).

3.4 Einfluß der H_2O_2 -Konzentration

Um den Anteil den Wasserstoffperoxid über den 'shunt' Reaktionsweg zur 12-pNCA-Umsetzung durch P450 BM-3 F87A beiträgt, zu bestimmen, wurden 12-pNCA und P450 BM-3 F87A mit variierten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen inkubiert. Im Bereich von 8–20 μM Wasserstoffperoxid wird bei vergleichbaren P450 BM-3 F87A Aktivitäten nach einer Minute bei einem 20–25%igen Umsatz eine Plateau erreicht, unabhängig von der Wasserperoxidkonzentration. Die weitere Zugabe von NADPH im Überschuß (100 μM) zeigt, daß P450 BM-3 F87A durch Wasserstoffperoxid

nicht vollständig inaktiviert wird. Die Restaktivitäten sind bei geringen Wasserstoffperoxid-Konzentration hoch und sinken mit zunehmender Wasserstoffperoxid-Konzentration (nicht gezeigt).

Um die Stabilität von P450 BM-3 gegenüber Wasserstoffperoxid zu bestimmen, wurde P450 BM-3 F87A in Abwesenheit von Substrat (12-pNCA) 5 min mit variierten Wasserstoffperoxidsmengen inkubiert. Nach Zugabe von Katalase (600 U) und 60 nmol Substrat wurden die Umsatzgeschwindigkeiten unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator bestimmt.

Wie in Fig. 10 gezeigt, inhibieren in Abwesenheit von Substrat bereits Wasserstoffperoxid-Konzentrationen im 5 µM-Bereich die P450 BM-3 F87A Aktivität deutlich. Als Konsequenz ergibt sich hieraus für einen P450 BM-3 F87A Enzym-Membran-Reaktor, bei möglichst hohen Substratkonzentrationen zu arbeiten und die Wasserstoffperoxidbildung durch Katalase- oder Anti-Oxidant-Zugabe zu minimieren.

Patentansprüche

1. Elektronendonorsystem für die Übertragung von Elektronen auf Enzyme mit Redox-Eigenschaften, dadurch gekennzeichnet, daß das System eine anorganische, nicht elektrodengebundene Elektronenquelle und einen Mediator umfaßt, der zur Übertragung von Elektronen von der Elektronenquelle auf das Enzym befähigt ist. 15
2. Elektronendonorsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym ein Cytochrom P450-haltiges Enzym ist.
3. Elektronendonorsystem nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Monooxygenase (E. C. 1.14.-.-) ist. 20
4. Elektronendonorsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediator ein Standard-Normalpotential im Bereich von weniger als etwa -0,4 V besitzt.
5. Elektronendonorsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediator ausgewählt ist unter Kobalt(III)sepulchrat, Methylviologen, Neutralrot, Riboflavin, Rutheniumtriacetat, FMN und FAD. 25
6. Elektronendonorsystem nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektronenquelle ein Metall mit einem niedrigeren Standard-Normalpotential als der Mediator ist.
7. Elektronendonorsystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektronenquelle metallisches Zink ist.
8. Elektronendonorsystem, nach einem der vorhergehenden Ansprüche, ausgewählt unter den Systemen: 30
 - Zn/Kobalt(III)sepulchrat und
 - Zn/Neutralrot.
9. Verfahren zur enzymatischen Übertragung von Sauerstoff auf ein Kohlenwasserstoff-haltiges Wasserstoffdonor-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß man das Wasserstoff-Donormolekül in einem Reaktionsmedium, umfassend das Sauerstoff-übertragende Enzym und ein Elektronendonorsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8, in Gegenwart von Sauerstoff unter Reaktionsbedingungen inkubiert. 35
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Wasserstoff-Donormolekül ausgewählt ist unter Verbindungen der Formel
- R-X 40
- worin
- R für einen Alkylrest mit 10 oder mehr Kohlenstoffatomen steht, und
- X für eine polare, zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigte Gruppe, vorzugsweise eine Carboxy-, Amid-, Nitril-, Sulfat-, Sulfon- Amin- oder Hydroxygruppe, steht. 45
11. Verfahren zur enzymatischen Herstellung terminal oder subterminal (Position ω-1 bis -4) hydroxylierter Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) eine hydroxylierbare Fettsäure oder Fettsäurederivat in Gegenwart eines Elektronendonorsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einer Cytochrom P-450 Monooxygenase und Sauerstoff umsetzt; und
 - b) das (die) hydroxylierte(n) Produkte) isoliert. 50
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das ω-hydroxylierbare Fettsäurederivat ausgewählt ist unter terminal gesättigten, verzweigten oder unverzweigten Fettsäuren mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen, insbesondere C₁₂-C₃₀-Fettsäuren.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Cytochrom P-450 Monooxygenase ist, ausgewählt unter: 55
 - a) dem aus *Bacillus megaterium* (DSM 32T) isolierbaren Wildtypenzym; oder
 - b) einer durch Aminosäuresubstitution in wenigstens einer der Position 26, 47, 72, 74, 87, 188 und 354 erhältlichen Mutanten des Wildtypenzym.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutante in Position 87 die Mutation F87A oder F87V und gegebenenfalls wenigstens eine weitere der folgenden Mutationen aufweist: L188K, A74 G, R47F und V26T. 60
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Elektronendonorsystem Zink/Co(III)sepulchrat ist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß man zumindest Stufe a) in Gegenwart von Chloridionen durchführt. 65
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man zumindest Stufe a) in Gegenwart eines Wasserstoffperoxyd-spaltenden Enzyms durchführt.
18. Bioreaktor zur Verwendung bei der Herstellung ω-hydroxylierter Fettsäuren, gekennzeichnet durch irrtobili-

sierte Monooxygenase und ein Elektronendonorsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8 im flüssigen Reaktionsmedium.

19. Nachweisverfahren für Fettsäure-Monooxygenasen, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) einen Analyten, in dem man Enzymaktivität vermutet, mit einer ω -hydroxylierbaren Fettsäure oder Fettsäurederivat, welche(s) einen terminalen, 3 abspaltbaren Chromophor oder Fluorophor trägt, in Gegenwart eines Elektronendonorsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 8 inkubiert; und
b) die Abspaltung des Chromophors oder Fluorophors qualitativ oder quantitativ bestimmt.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß man die Umsetzung in Gegenwart eines Wasserstoffperoxydspaltenden Enzyms und gegebenenfalls in Gegenwart von Chloridionen durchführt.

21. Testkit, umfassend ein Elektronendonorsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

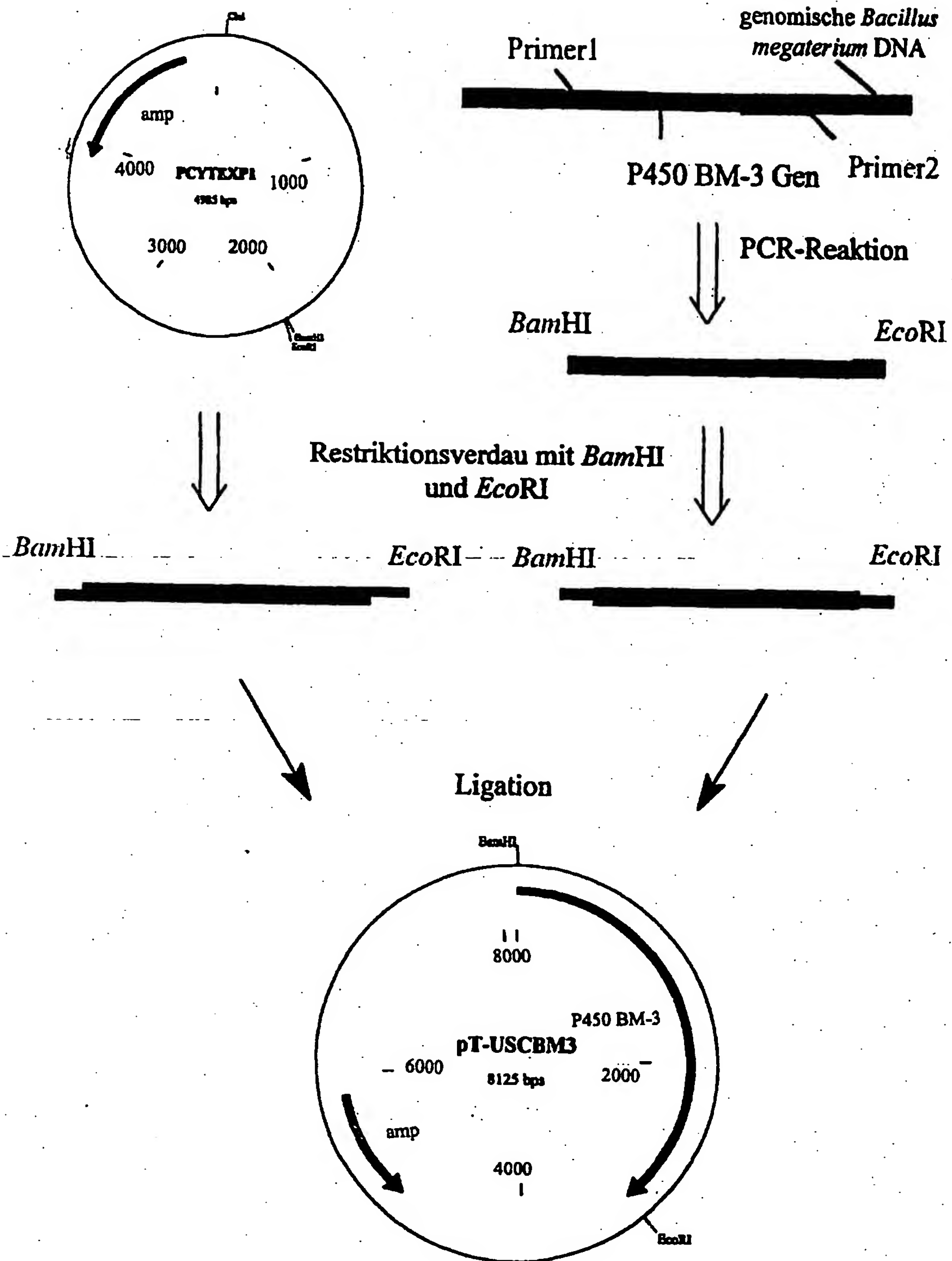


Fig.1

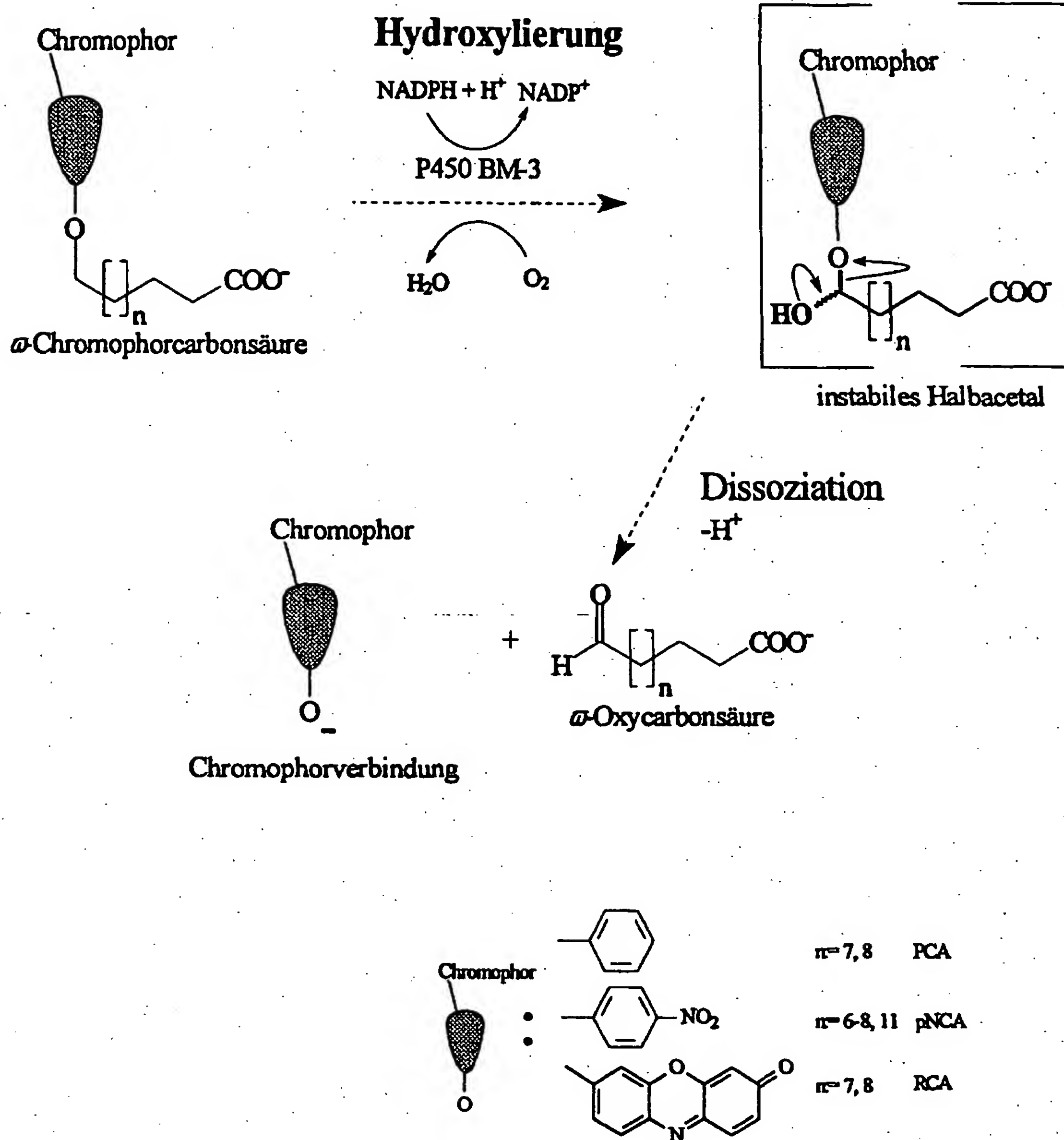


FIG.2

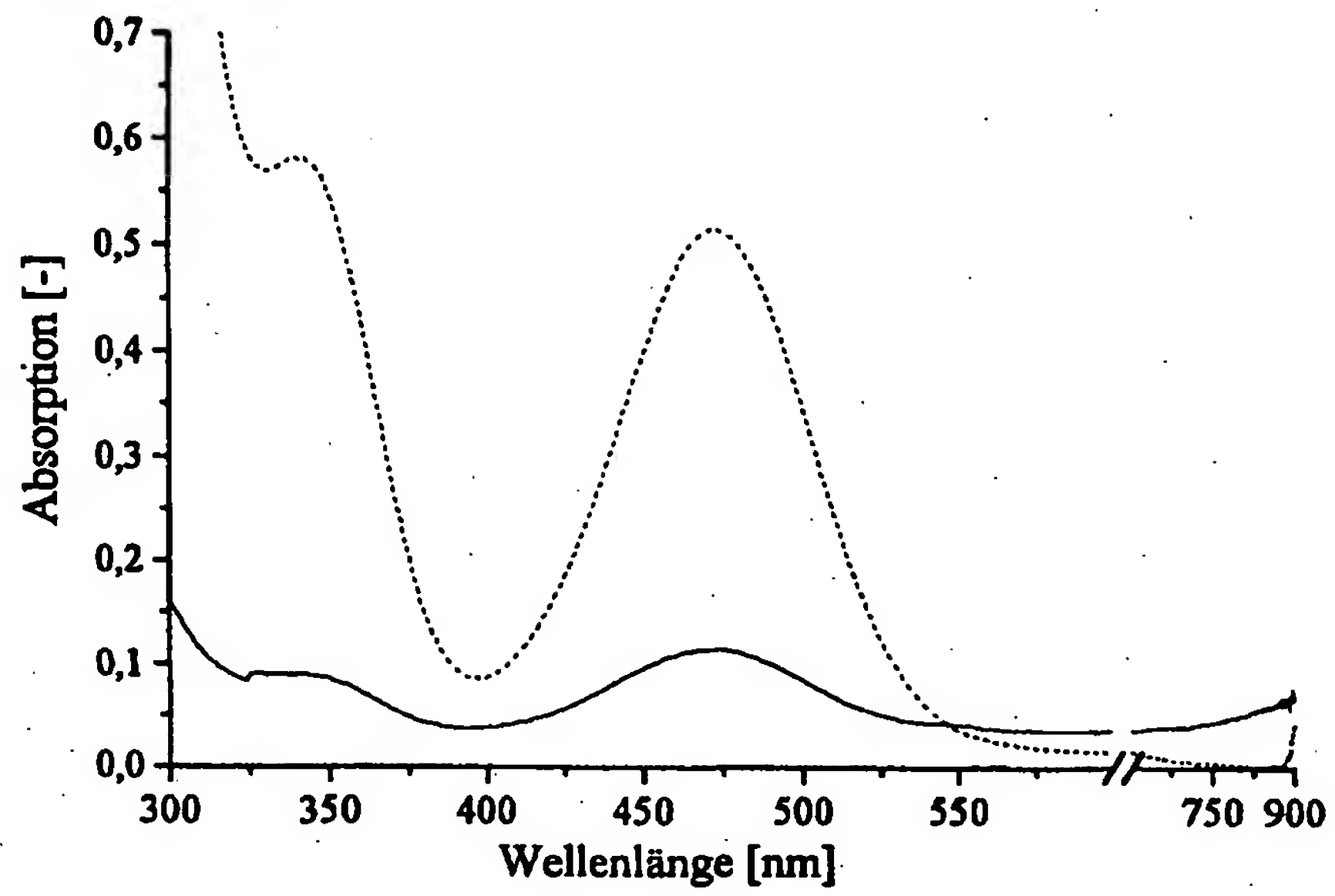


Fig.3

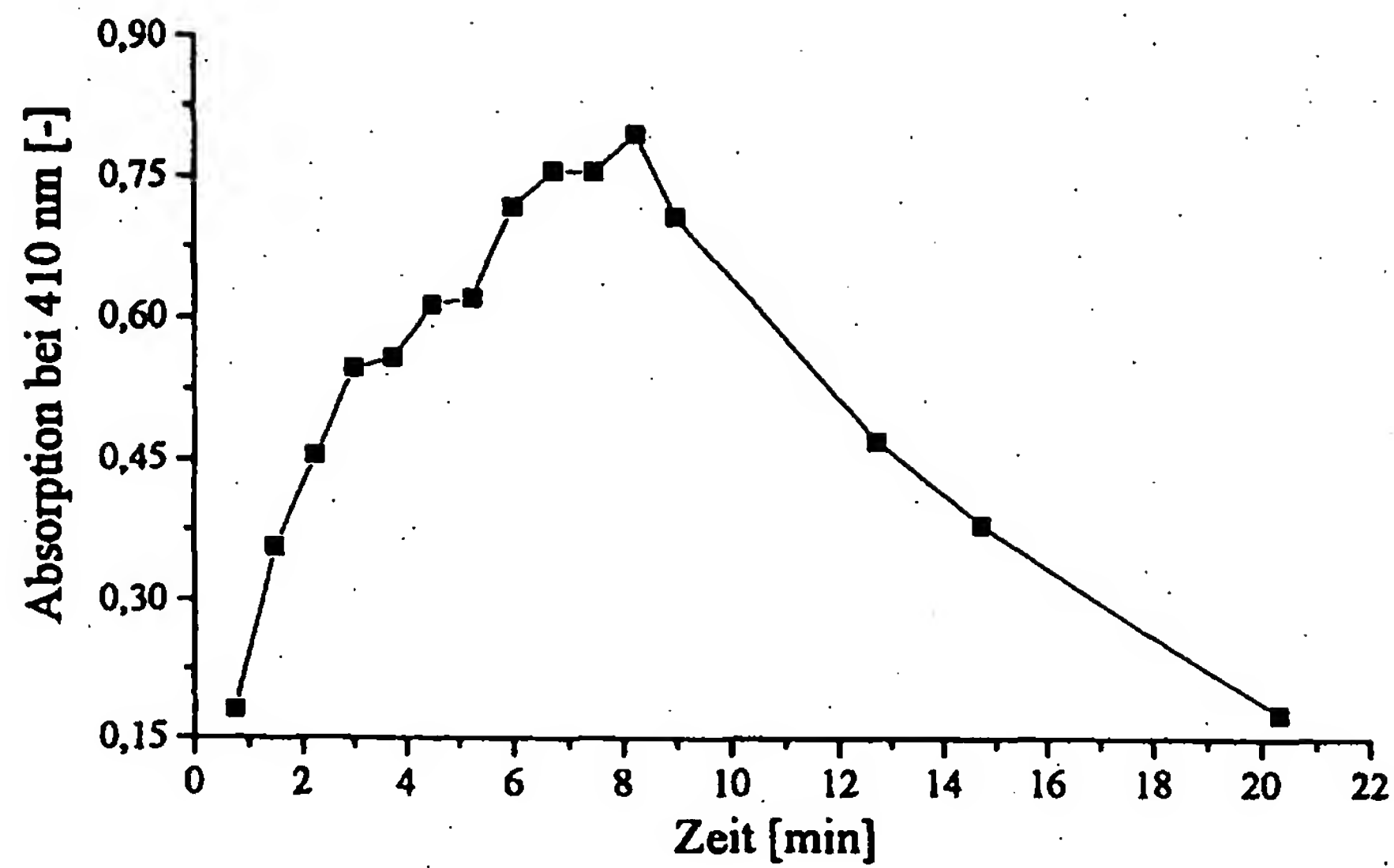


Fig.4

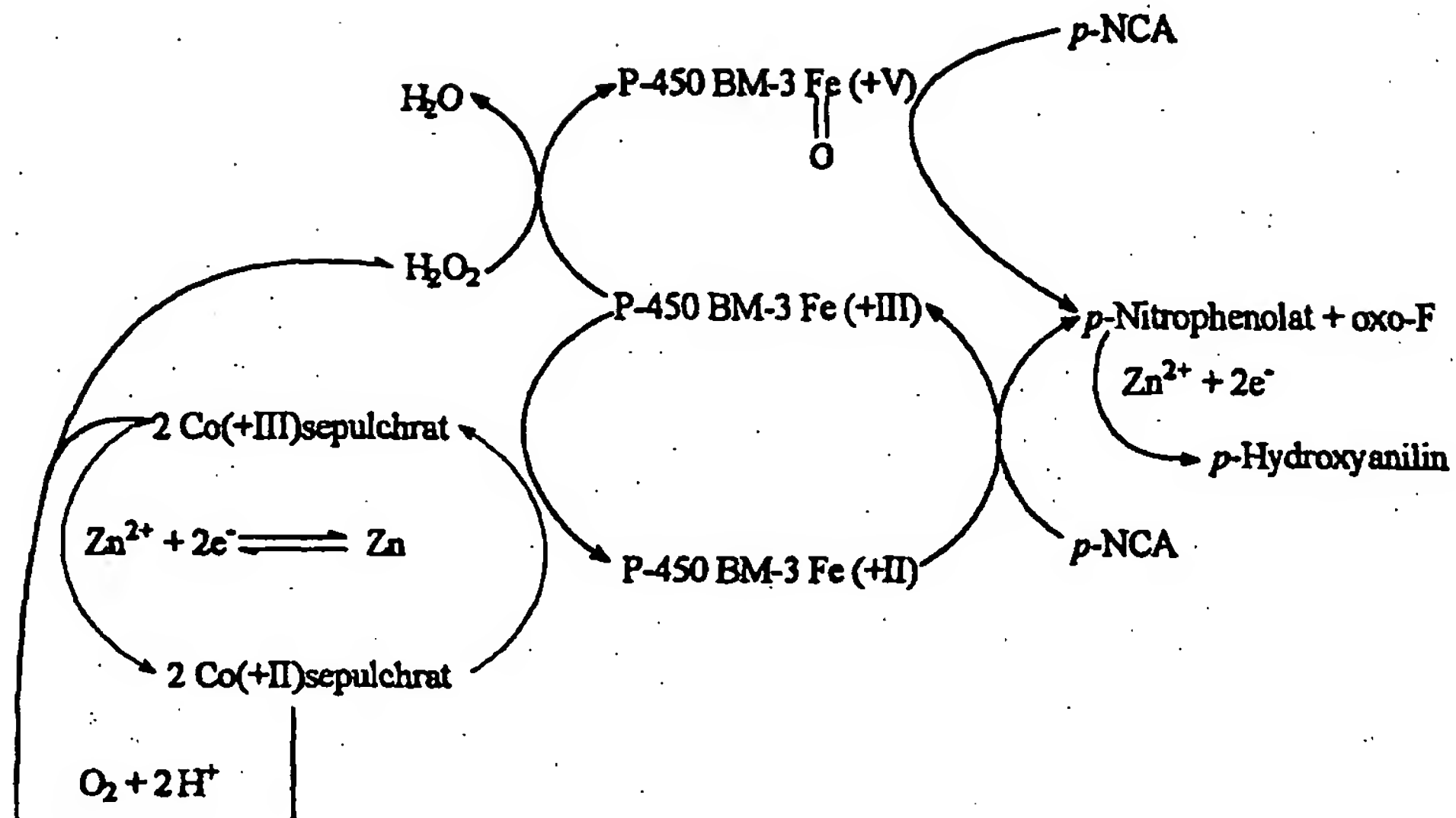


Fig.5

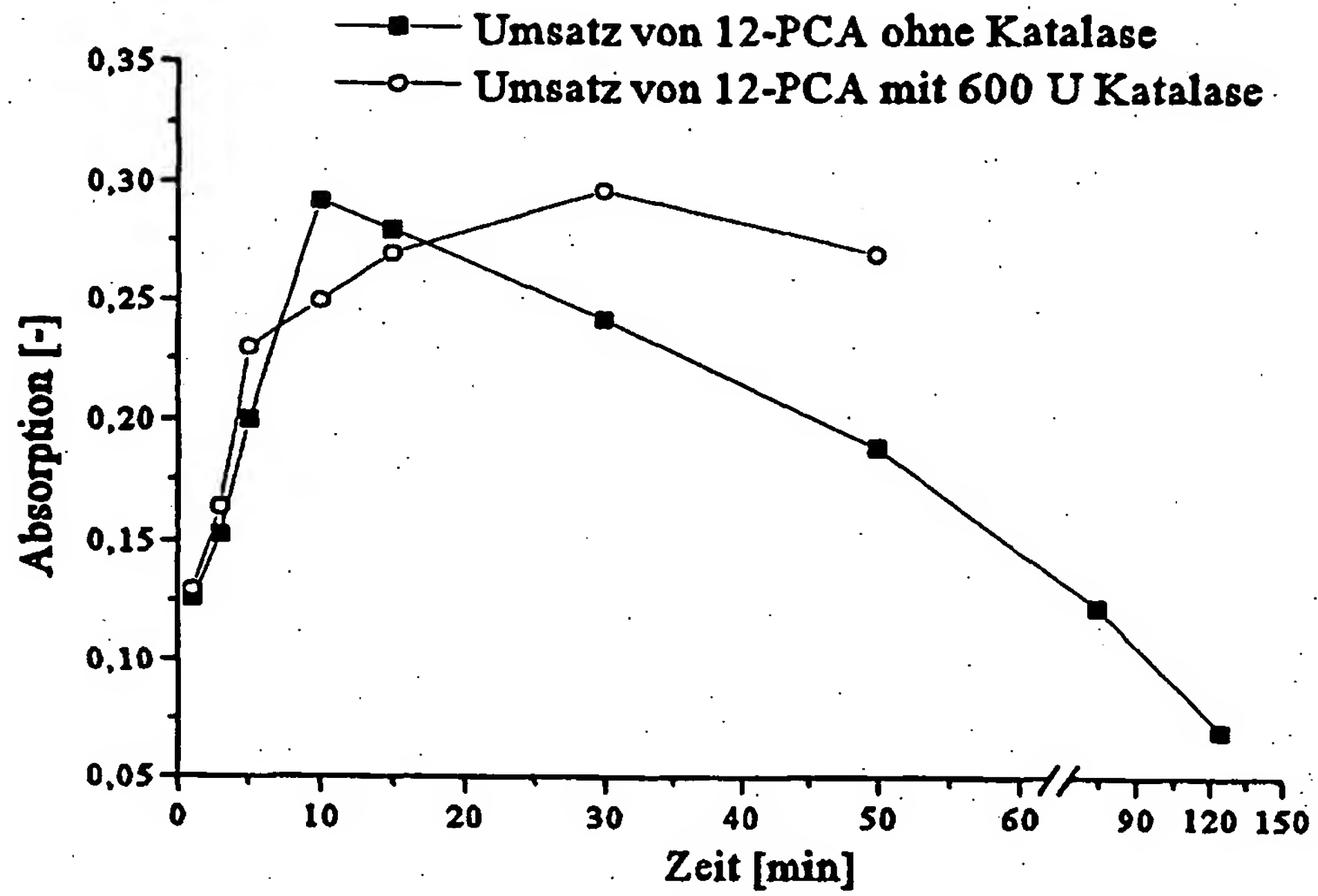


Fig.6

- Einfluß des Puffers auf *p*-Nitrophenol-Reduktion
- Einfluß des Puffers auf Cobalt(II)sepulchrate-Reduktion
- ▲— Einfluß des Puffers auf die 12-pNCA/P450 BM-3 F87A Aktivität

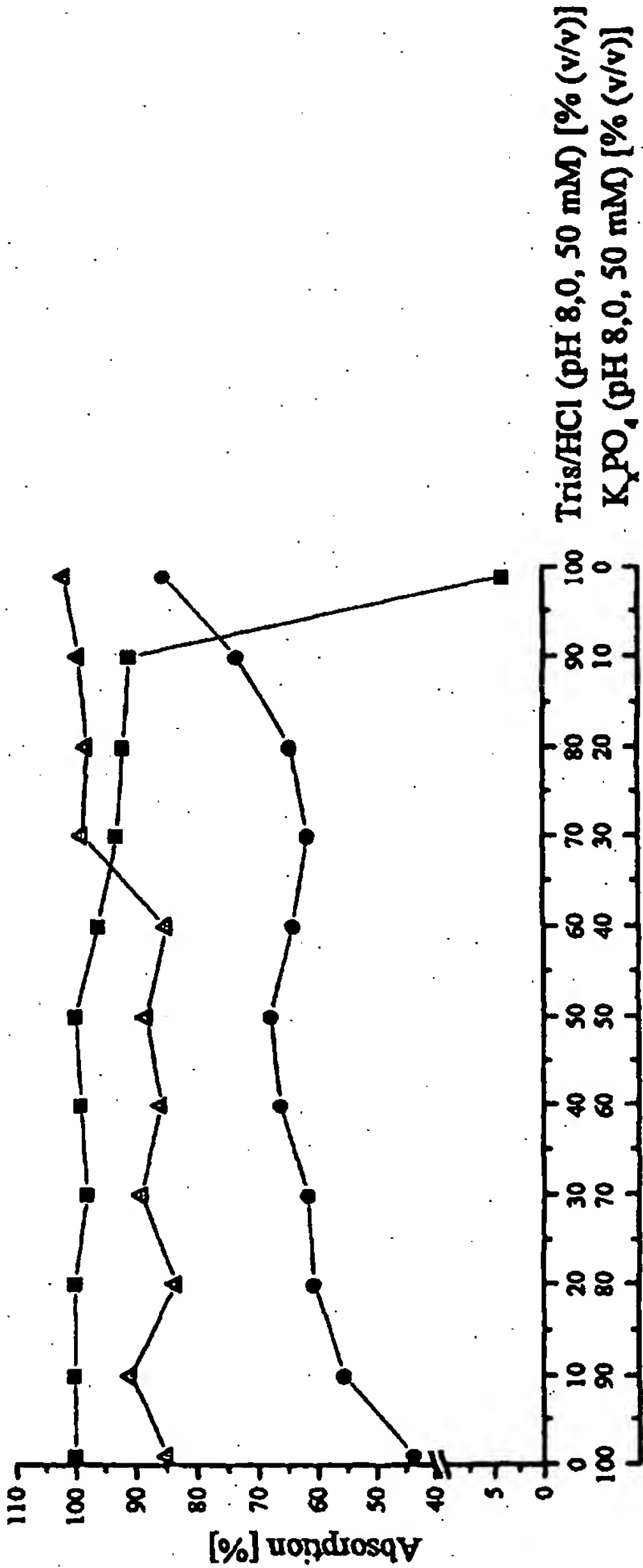


Fig.7

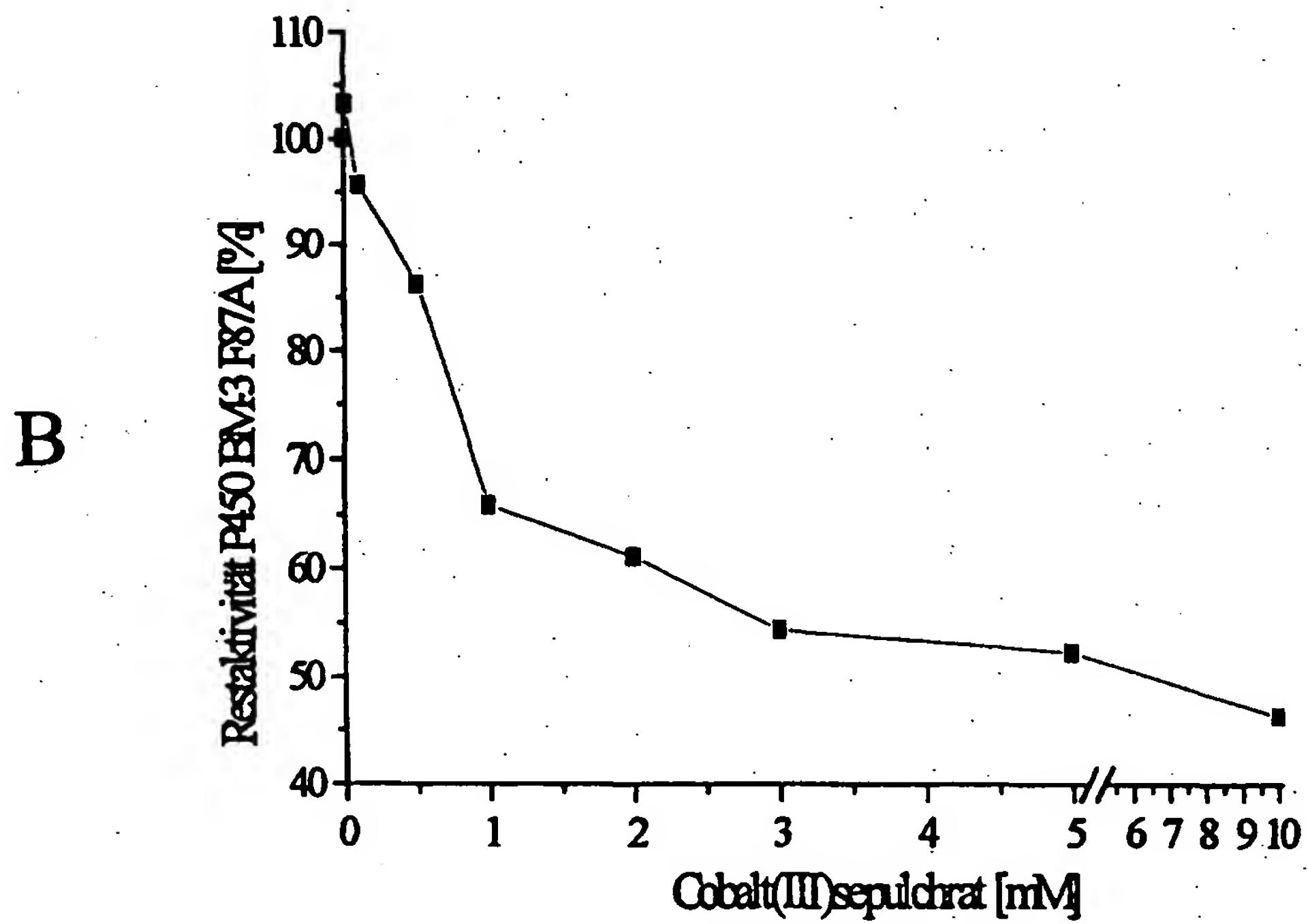
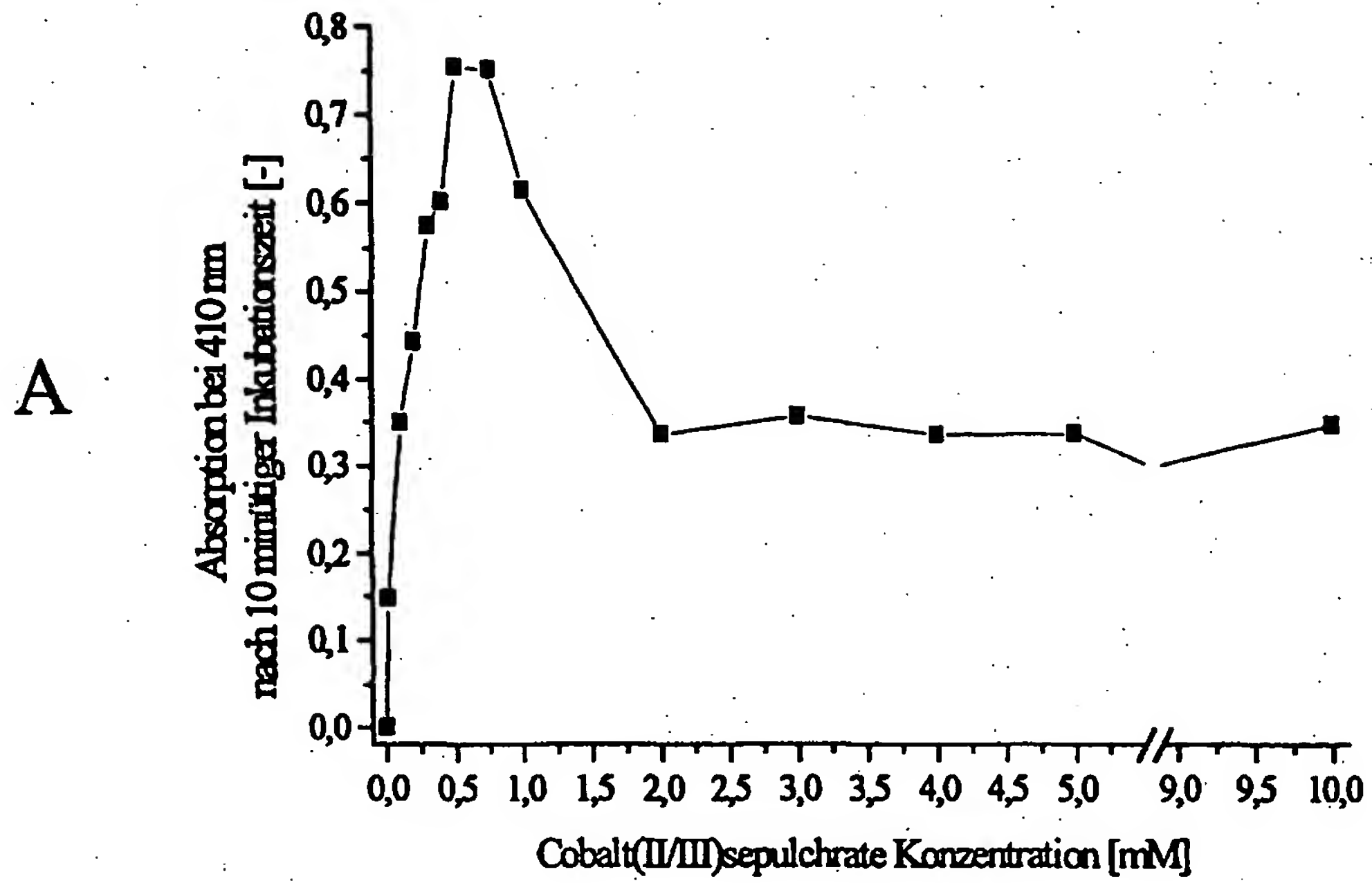


Fig.8

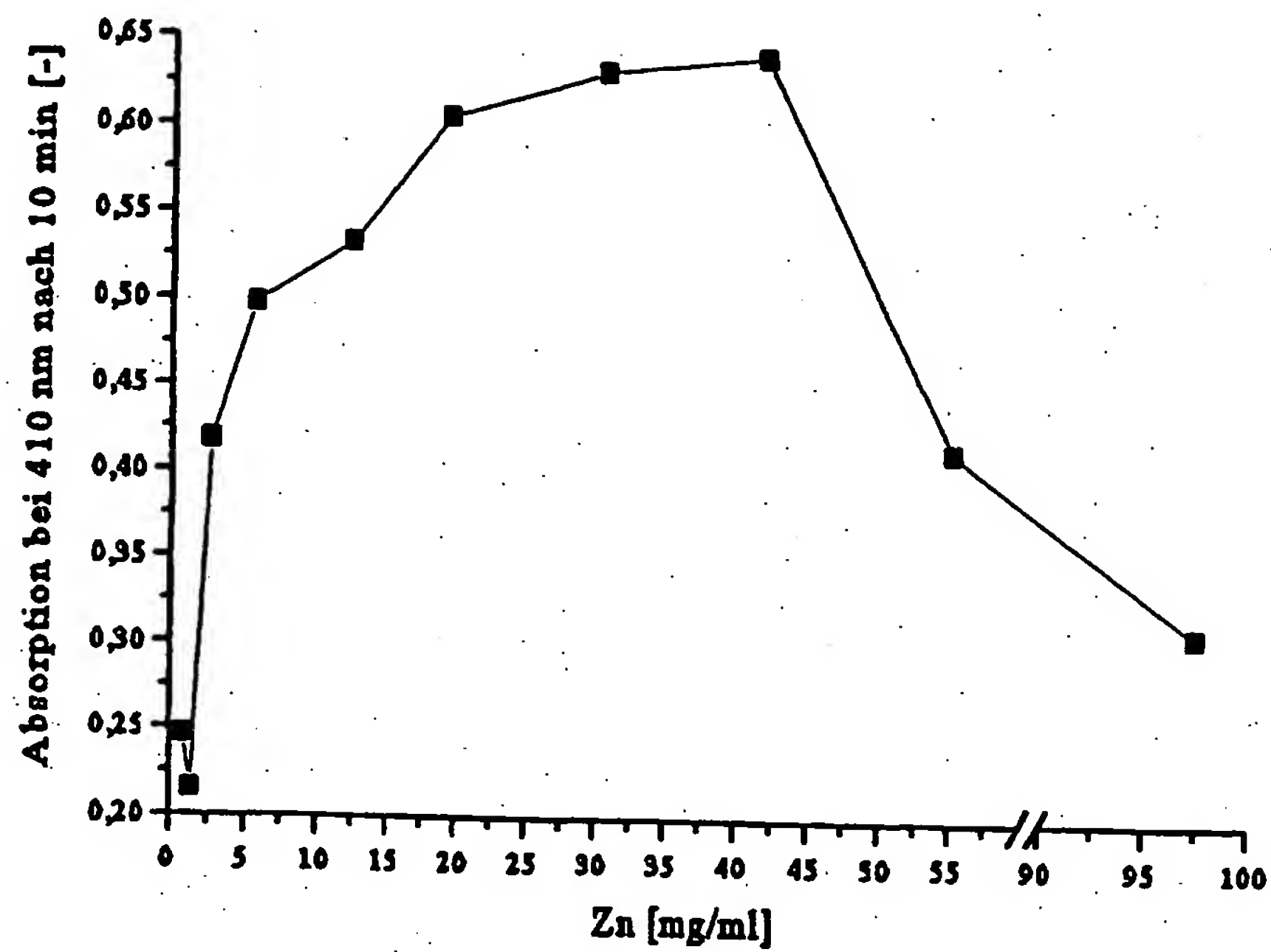


Fig.9

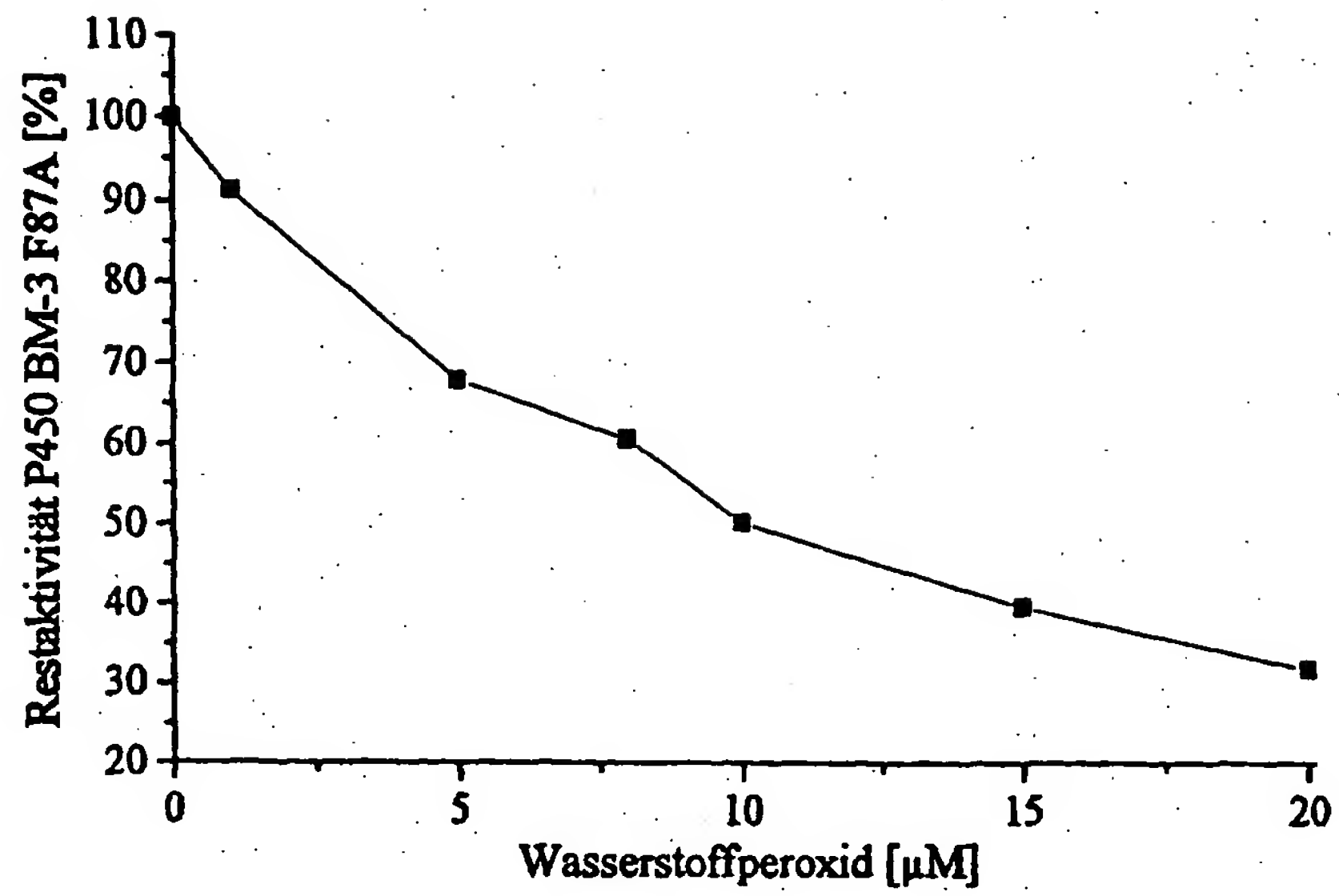


Fig.10